



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES E NANOEMULSÕES A PARTIR DA
MICROALGA *Spirulina***

Lisiane Fernandes de Carvalho

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES E NANOEMULSÕES A PARTIR DA
MICROALGA *Spirulina***

Lisiane Fernandes de Carvalho

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
doutor em Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Orientador

RIO GRANDE, RS

2014

Aos meus pais, Maria Lucia e Eduardo

A minha irmã Catia

Ao meu marido Gabriel

Dedico

Agradecimentos

Aos meus pais Maria Lúcia Macedo Fernandes e Eduardo Henrique Novo de Carvalho,
pelo exemplo, amor, educação, incentivo e por tantas outras coisas.

Ao meu marido Gabriel Senna da Rosa,
pelo amor, incentivo, compreensão e companheirismo em todos os momentos.

À minha irmã Catia Fernandes de Carvalho,
pelo exemplo, carinho e incentivo.

À minha família,
pelo carinho e apoio.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa,
pela orientação, ensinamentos, oportunidades, apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Richard Gross,
pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho e acolhida em sua equipe nos USA.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,
pelos ensinamentos e disponibilidade.

À Mariana Oliveira,
pela amizade e dedicação em parte deste trabalho.

**As amigas Ana Claudia Margarites, Thaisa Santos, Ana Priscila Centeno da Rosa,
Elisangela Radmann, Sabrina de La Rocha, Celia Centeno da Rosa, Shana Ferreira e
Cristiane Lisboa,**
pela amizade, incentivo, disposição em ajudar e pelos momentos vivenciados no LEB.

À Amanda Koh,
pela amizade e auxílio em parte deste trabalho.

À Mia Falkeborg e Ranjani Sargunraj,
pela amizade e convívio durante minha estada nos EUA.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB),
pela amizade, momentos de descontração e contribuição que de uma forma ou de outra deram
ao trabalho.

Ao Roque Zílio,
pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande,
por proporcionar um programa de pós-graduação de qualidade e gratuito.

À CAPES,
pela concessão de bolsa de pós-graduação.

Muito Obrigada!

"N3o 3 necess3rio ver toda a escada. Apenas d3 o primeiro passo."
Martin Luther King Jr.

RESUMO

As microalgas têm sido foco de muitos estudos tendo em vista sua grande aplicabilidade na indústria de alimentos e farmacêutica, como também nas áreas da biomedicina e ambiental. A *Spirulina* é uma microalga que possui alto valor nutricional, apresenta alto teor proteico e é rica em substâncias bioativas. Esta microalga apresenta em sua composição compostos como glicolípidios, fosfolipídios e lipídios neutros, que por sua vez possuem efeito biossurfactante. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a potencialidade de produção de biossurfactantes a partir de diferentes cepas de *Spirulina*. Para isso, foram realizados experimentos utilizando Delineamento Fatorial Completo 2^2 , visando avaliar a influência da concentração de fósforo e nitrogênio no cultivo das microalgas *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18, como também nos extratos oriundos das microalgas, através da medida da tensão superficial. Foi também avaliada a influência destes nutrientes em extratos de *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18 a partir do índice de emulsificação e diâmetro médio das gotículas das emulsões preparadas a partir dos extratos. Para extrações de biossurfactantes foram testados os solventes metanol, etanol e hexano. Nas formulações das nanoemulsões utilizou-se homogeneizador de alta velocidade, como fase aquosa os extratos oriundos das microalgas e como fase oleosa, óleo de girassol. As formulações foram preparadas utilizando-se diferentes concentrações da fase aquosa e oleosa, bem como diferentes velocidades e tempos de agitação. De acordo com os cultivos de *Spirulina platensis* Paracas realizados foi verificado que o cultivo que atingiu maior valor de concentração máxima de biomassa e maior produtividade foi realizado com 114 mg.L^{-1} de fósforo e sem adição de nitrogênio. Porém em relação às microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18, as variáveis fósforo e nitrogênio não apresentaram influência significativa na concentração máxima de biomassa e produtividade máxima. O extrato que apresentou a menor tensão superficial ($26,75 \text{ mN.m}^{-1}$) foi verificado quando foi utilizado etanol como solvente, sendo este obtido a partir de cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 realizado sem adição de nitrogênio e de fósforo. Em relação ao índice de emulsificação foram atingidos valores superiores a 59%, porém as concentrações utilizadas de nitrogênio e fósforo não apresentaram influência significativa nesta resposta. Neste trabalho foi possível obter nanoemulsões estáveis por até 30 d e com diâmetro médio de gotículas de até 532 nm. Os resultados obtidos neste trabalho são favoráveis à pesquisa na aplicação tanto dos extratos microalgais como das nanoemulsões obtidas apresentando potencialidade de uso em diversos processos industriais, como nas áreas ambiental, farmacêutica, cosmética e alimentos.

Palavras-chave: cultivo, nanoemulsões, tensão superficial.

ABSTRACT

Microalgae has been the focus of many studies because their wide application in the food and pharmaceutical industry, as well as in the areas of biomedicine and environmental. *Spirulina* is a microalga that has high nutritional value with high protein content and is rich in bioactive substances. This microalga has compounds in its composition as glycolipids, phospholipids and neutral lipids, which in turn have biosurfactant effect. The aim of this study was to verify the capability of producing biosurfactants from different strains of *Spirulina*. For this, experiments were performed using Full Factorial Design 2², for evaluate the influence of the concentration of phosphorus and nitrogen in the cultivation of microalgae *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 and *Spirulina* sp. LEB 18, as well as in extracts of these microalgae by measuring the surface tension. Also, were evaluated the influence of these nutrients in *Spirulina platensis* LEB 52 and *Spirulina* sp. LEB 18 extracts by emulsification index and average diameter of the droplets of the emulsions prepared from the extracts. For biosurfactants extraction were tested the solvents methanol, ethanol and hexane. In the preparation of the nanoemulsions was used a high speed homogenizer, and as aqueous phase were used extracts derived from microalgae and as oil phase, sunflower oil. The formulations were prepared using different concentrations of the aqueous and oil phase as well as different times and stirring speeds. According to the cultivation of *Spirulina platensis* Paracas performed it was found that cultivation which achieved a higher value of the maximum biomass concentration and maximum productivity was carried out with 114 mg.L⁻¹ phosphorus and without addition of nitrogen. But regarding the microalgae *Spirulina platensis* LEB 52 and *Spirulina* sp. LEB 18, phosphorus and nitrogen variables showed no significant influence on the maximum biomass concentration and maximum productivity. The extract with the lowest surface tension (26.75 mN.m⁻¹) was observed when ethanol was used as solvent, which is obtained from cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 performed without addition of nitrogen and phosphorus. Regarding the emulsification index, were reached values higher than 59%, but the concentrations of nitrogen and phosphorus used showed no significant influence on this response. In this work it was possible to obtain stable nanoemulsions for up to 30 d with a mean diameter of droplets up to 532 nm. The results obtained in this study are in favor of research in the application of both microalgal extracts of nanoemulsions obtained as potential use in various industrial processes such as in the environmental, pharmaceutical, cosmetic and food.

Keywords: cultivation, nanoemulsions, surface tension.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk	23
---	----

CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - Avaliação da influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo no cultivo e na produção de biossurfactantes pela microalga *Spirulina*

Tabela 1 – Níveis reais e codificados das variáveis fósforo (P) e nitrogênio (N) para os cultivos das microalgas.	44
Tabela 2 - Concentração máxima de biomassa (X_{max}), produtividade máxima (P_{max}) dos cultivos e tensão superficial (TS) dos extratos obtidos nos cultivos realizados de acordo com Delineamento Fatorial Completo 2^2 com triplicata no ponto central.....	51
Tabela 3 - Análise de variância para concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) e produtividade máxima ($P_{máx}$) dos cultivos de <i>Spirulina platensis</i> Paracas.....	52
Tabela 4 - Equações e coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir dos modelos para as respostas concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) e produtividade máxima ($P_{máx}$).	52

ARTIGO II: Formação de nanoemulsões a partir de extratos oriundos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produzida em escala piloto

Tabela 1 - Tensão superficial (TS) e Índice de emulsificação (I) após 1 d de extratos obtidos através da utilização de esferas de vidro ou ultrassonicadas.	68
Tabela 2 - Tensão superficial (TS) e Índice de Emulsificação após 1 d (I) de extratos obtidos utilizando-se diferentes solventes.....	69
Tabela 3 - Parâmetros de estabilidade das diferentes nanoemulsões preparadas com 0,1% de óleo de girassol e agitação de 24000 rpm durante 5, 15 e 30 min.	72

ARTIGO III: Capacidade emulsificante de extratos obtidos a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52

Tabela 1 - Níveis reais e codificados das variáveis fósforo (P) e nitrogênio (N) para os cultivos das microalgas.	80
Tabela 2 - Tensão superficial (TS), Índice de emulsificação (I) e diâmetro médio (D) das gotículas após 15 d das emulsões preparadas a partir dos extratos e com 10% de óleo girassol.	84
Tabela 3 - Análise de variância para tensão superficial dos extratos (TS-SL18), diâmetro médio das gotículas das emulsões (D-SL18) obtidas a partir da microalga	

<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos (TS-SL52) oriundos de <i>Spirulina platensis</i> LEB 52.	87
Tabela 4 - Equações e coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir dos modelos para tensão superficial dos extratos e diâmetro médio das gotículas das emulsões obtidas a partir das microalgas.	87
Tabela 5 - Diâmetro médio (D) das gotículas e pH das nanoemulsões obtidas a partir das microalgas <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Spirulina platensis</i> LEB 52 no período de 1, 15 e 30 d.	91

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Microalga *Spirulina* (aumento de 40x).23

Figura 2 – Representação do dodecilbenzenossulfonato de sódio e de uma micela.....28

CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - Avaliação da influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo no cultivo e na produção de biossurfactantes pela microalga *Spirulina*

Figura 1- Concentração de biomassa (---), Nitrogênio (N) (\blacktriangle) e Fósforo (P) (\triangleleft) para os ensaios (a) sem adição de P e N, (b) 114 mg.L⁻¹ P e sem adição de N, (c) sem adição de P e 412 mg.L⁻¹ N, (d) 114 mg.L⁻¹ P e 412 mg.L⁻¹ N, (e) 57 mg.L⁻¹ P e 206 mg.L⁻¹ N, (f) 57 mg.L⁻¹ P e 206 mg.L⁻¹ N e (g) 57 mg.L⁻¹ P e 206 mg.L⁻¹ N para as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (preto), *Spirulina platensis* LEB 52 (vermelho) *Spirulina platensis* Paracas (azul).47

Figura 2 – Valores observados x Valores preditos pelos modelos para produtividade .53

Figura 3 – Superfícies de resposta para concentração máxima de biomassa (a) e para produtividade máxima (b) da microalga de *Spirulina platensis* Paracas.53

Figura 4 - Diagrama de efeito das variáveis concentração de fósforo e nitrogênio sobre a tensão superficial dos extratos obtidos a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18....55

ARTIGO II: Formação de nanoemulsões a partir de extratos oriundos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produzida em escala piloto

Figura 1 - Diâmetro das gotículas presentes nas emulsões elaboradas com 0,1% e 10% de óleo girassol após (\triangleleft) 1 e (\triangleleft) 15 d.70

Figura 2 - Emulsões preparadas com 10% de óleo girassol (a) e 0,1% de óleo girassol (b).70

Figura 3 - Diâmetro das gotículas presentes nas nanoemulsões preparadas com 0,1% de óleo de girassol e agitação de 24000 rpm durante 5, 15 e 30 min após (\triangleleft) 1, (\triangleleft) 15 e (\triangleleft) 30 d.71

Figura 4 - Nanoemulsões preparadas com 0,1% de óleo de girassol e agitação de 24000 rpm durante 5 (a), 15 (b) e 30 min (c).72

ARTIGO III: Capacidade emulsificante de extratos obtidos a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52

- Figura 1** - Diagrama de efeito das variáveis concentração de fósforo e nitrogênio sobre o diâmetro médio das gotículas presentes nas emulsões formadas a partir de extratos oriundos da microalga *Spirulina platensis* LEB 52..... 86
- Figura 2** - Emulsões formadas com 10% de óleo girassol obtidas a partir de extratos provenientes das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (a) e *Spirulina platensis* LEB 52 (b). 86
- Figura 3** – Valores observados x Valores preditos pelos modelos para tensão superficial dos extratos (a) e diâmetro médio das gotículas das emulsões (b) obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos (c) oriundos de *Spirulina platensis* LEB 52..... 88
- Figura 4** - Superfícies de resposta geradas a partir do modelo obtido para tensão superficial dos extratos (a), diâmetro médio das gotículas das emulsões (b) obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos (c) oriundos de *Spirulina platensis* LEB 52..... 89
- Figura 5** - Nanomulsões formadas com 0,1% de óleo girassol obtidas a partir de extratos proveniente das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (a) e *Spirulina platensis* LEB 52 (b)..... 92

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO.....	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Microalgas	22
3.1.1 Microalga <i>Spirulina</i>	22
3.2 Condições de cultivo de microalgas	25
3.3 Surfactantes e biossurfactantes	27
3.3.1 Produção de biossurfactantes	30
3.3.2 Métodos de extração	32
3.3.3 Atividade biossurfactante	34
3.3.4 Aplicações de biossurfactantes	35
3.4 Formação de nanoemulsões	35
3.4.1 Estabilidade de nanoemulsões	36
CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	38
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	39
ARTIGO I - Avaliação da influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo no cultivo e na produção de biossurfactantes pela microalga <i>Spirulina</i>	40
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Micro-organismos e condições de cultivo	44
2.2 Crescimento celular	45
2.3 Determinação de nitrogênio e fósforo.....	45
2.4 Extração de biossurfactantes das microalgas	45
2.5 Atividade biossurfactante	46
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4 CONCLUSÕES	55

REFERÊNCIAS.....	56
ARTIGO II: Formação de nanoemulsões a partir de extratos oriundos da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 produzida em escala piloto	60
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
1 INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Micro-organismo e condições de cultivo	64
2.2 Rompimento celular e extração dos biossurfactantes da microalga.....	64
2.3 Determinação da tensão superficial.....	65
2.4 Determinação do índice de emulsificação.....	65
2.5 Preparo das emulsões e nanoemulsões	66
2.6 Análise do tamanho de gotículas das emulsões e nanoemulsões	66
2.7 Determinação do valor de pH das nanoemulsões.....	67
2.8 Determinação do potencial zeta das nanoemulsões	67
2.9 Análise estatística	67
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	73
ARTIGO III: Capacidade emulsificante de extratos obtidos a partir das microalgas <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Spirulina platensis</i> LEB 52.....	76
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	78
1 INTRODUÇÃO	79
2 MATERIAL E MÉTODOS	80
2.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	80
2.2 Extração de biossurfactantes das microalgas	81
2.3 Determinação da tensão superficial.....	81
2.4 Determinação do índice de emulsificação.....	81
2.5 Preparo das emulsões e nanoemulsões	82
2.6 Análise do tamanho de gotículas das emulsões e nanoemulsões	82
2.7 Determinação do valor de pH das nanoemulsões.....	83
2.8 Determinação do potencial zeta das nanoemulsões	83
2.9 Análise estatística	83

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES	97
5 CONCLUSÃO GERAL.....	98
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS	100
REFERÊNCIAS.....	101

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento na demanda por produtos naturais, estudos sobre cultivo de microalgas, principalmente referentes a compostos resultantes de sua biomassa, mostram-se promissores. Possibilitando assim a inserção de novas pesquisas que possam trazer benefícios ainda hoje desconhecidos (BATISTA et al., 2013; KOTHARI et al., 2013; RICHMOND, 2004).

De acordo com Brennan e Owende (2010) e Dismukes et al (2008) a maioria das microalgas é fonte de proteínas quando cultivadas em condições repletas de nutrientes. Porém, quando se realiza a restrição de alguns nutrientes, estes cultivos podem ser facilmente induzidos para alterar a composição microalgal.

A microalga *Spirulina* vem sendo estudada quanto a sua utilização como suplemento alimentar e também por apresentar grande potencial para produção de compostos bioativos (CARVALHO, 2010; CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012; GAD et al., 2011; SAJILATA; SINGHAL; KAMAT, 2008). Esta microalga pode ser utilizada em indústrias de alimentos e farmacêutica, pois não apresenta riscos de toxicidade e patogenicidade (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) (FDA, 2002; MENDONÇA; DRUZIAN; NUNES, 2012).

A *Spirulina* apresenta em sua composição compostos como glicolípidios, fosfolípidios e lípidios neutros (MENDES; REIS; PALAVRA, 2006), os quais são classificados como biossurfactantes (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Biossurfactantes são compostos que apresentam uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica em sua estrutura, diante destas características atuam como agentes ativos de superfície capazes de reduzir a energia livre do sistema, reduzindo a tensão superficial e interfacial (MULLIGAN, 2005).

A estimulação na microalga à produção de biossurfactantes pode ser conseguida com uso de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e outros nutrientes. A produção de biossurfactantes também pode ser influenciada pelas condições de cultivo como pH, temperatura e agitação (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

A maioria dos surfactantes utilizados nas indústrias é derivada do petróleo, entretanto a necessidade de produtos menos agressivos fez aumentar o interesse por surfactantes microbianos (biossurfactantes) nas últimas décadas (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Os biossurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os

surfactantes de origem química, tais como, baixa toxicidade, tolerância à temperatura, pH, além de serem biodegradáveis na água e no solo (LIN, 1996).

A produção de biossurfactantes por diversos micro-organismos tem sido amplamente estudada, apresentando uma gama de dados bastante relevantes sobre aplicação, tipo, bem como suas propriedades (DONIO et al., 2013; DUBEY et al., 2012; GUDINA et al., 2013; MARTI et al., 2014). Porém, não são encontrados estudos relacionados à produção de biossurfactantes a partir de microalgas.

Nas indústrias de alimentos, as principais aplicações dos biossurfactantes são a formação de emulsões, estabilização de sistemas aerados, modificação das propriedades reológicas, solubilização de aromas, bem como as propriedades antimicrobianas que tornam estes compostos importantes para o controle de micro-organismos patogênicos (NITSCHKE; COSTA, 2007; VASEL, 2009).

As nanoemulsões são bastante estudadas e apresentam possibilidades de expansão dentre as necessidades das indústrias em busca de alternativas tecnológicas, como na melhora da biodisponibilidade e solubilidade de diferentes compostos, principalmente nas áreas de alimentos, farmacêutica, cosmética, entre outras (ADJONU et al., 2014; KANDADI et al., 2012; SONNEVILLE-AUBRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004).

A manipulação de estruturas em nanoescala possibilita a utilização dessas na formação de componentes em sistemas maiores. Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, como tolerância à temperatura e alterações da reatividade química (FERREIRA; RANGEL, 2009).

A aplicação da nanotecnologia em alimentos apresenta inúmeras oportunidades que podem ser exploradas, como por exemplo, o encapsulamento de compostos bioativos, nanosensores e revestimentos protetores pós-colheita de frutas e hortaliças (ASSIS et al., 2012; BOUWMEESTER, 2009).

Dentro deste contexto, este estudo foi idealizado com o propósito de avaliar a produção de biossurfactantes pela microalga *Spirulina* e utilizar os extratos obtidos na formação de nanoemulsões. Parte deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (Rio Grande, Brasil) e parte realizada no Polytechnic Institute of New York University (New York, USA) e Rensselaer Polytechnic Institute (Troy, USA) sob orientação do Professor Richard Gross.

Pesquisas com microalgas no LEB vêm sendo realizadas desde 1996, já foram avaliados cultivos descontínuos e semicontínuos, biorreatores abertos e fechados, efeito de

fatores como temperatura e iluminância, biofixação de CO₂, formulação de alimentos adicionados de biomassa de *Spirulina*, produção de biocombustíveis, extração de biocompostos como ácidos graxos, ficocianina, biopolímero, entre outros (ANDRADE; COSTA, 2008; CARVALHO, 2010; COLLA et al., 2007; COSTA et al., 2006; MORAIS; COSTA, 2007; MORAIS; MIRANDA; COSTA, 2006; REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006). O LEB também desenvolve pesquisas sobre a produção de biossurfactantes e sua utilização em biorremediação de hidrocarbonetos, demonstrando a sua preocupação com a utilização de resíduos agroindustriais e a redução de impactos ambientais (MARTINS et al., 2008; PINTO, 2008; CERQUEIRA, 2007; COSTA, 2004).

A partir da junção de duas linhas de pesquisa do LEB, cultivo de microalgas e produção de biossurfactantes, foi realizado estudo visando selecionar microalgas com potencial para produzir biossurfactantes. Foi demonstrada a potencialidade das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Synechococcus nidulans* LEB-25, *Chlorella vulgaris* LEB-106, *Chlorella minutissima* LEB-108, *Chlorella homosphaera*, *Chlorella* sp. PROD1, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Tetraselmis suecica* OR para produção de biossurfactantes, tanto pela redução da tensão superficial e interfacial, como pelo aumento da atividade emulsificante. Sendo que a produção de biossurfactantes foi verificada intracelularmente nas microalgas *Chlorella* sp. PROD1, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Tetraselmis suecica* OR e nas demais microalgas extracelularmente (RADMANN, 2011).

A equipe do Professor Richard Gross vem realizando estudos sobre biossurfactantes, como avaliação da atividade antimicrobiana destes compostos e modificações de soforolipídeos para utilização em nanoemulsões. Além disso, desenvolve pesquisas sobre biopolímeros para uso em engenharia de tecidos, novos métodos para a síntese do oligopeptídeos, transformações enzimáticas para sintetizar e modificar polímeros, entre outros (GUALANDI et al., 2010; LU et al., 2010; QIN et al., 2013; SLEIMAN et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a potencialidade de produção de biossurfactantes a partir de diferentes cepas de *Spirulina*.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar a influência dos nutrientes fósforo e nitrogênio no cultivo das microalgas *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18;

Analisar a influência dos nutrientes fósforo e nitrogênio na produção de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18 através de extração intracelular;

Formar nanoemulsões a partir de extratos oriundos da biomassa das microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18 e avaliar a estabilidade destas nanoemulsões;

Verificar a produção de biossurfactantes pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produzida em escala piloto, bem como a formação de nanoemulsões a partir de extratos oriundos de sua biomassa.

CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

As microalgas formam um grupo heterogêneo de organismos fotossintetizantes que podem ser eucarióticos ou procarióticos. São coloridas devido à presença dos pigmentos, e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (LI et al., 2008; OLAIZOLA, 2003).

As microalgas procarióticas, também chamadas de cianobactérias, surgiram há 3500 milhões de anos e foram os primeiros organismos fotossintetizantes capazes de produzir oxigênio, formando a atmosfera terrestre e possibilitando o surgimento de outras formas de vida no planeta (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; HENRIKSON, 1994).

O cultivo de microalgas há algumas décadas vêm aumentando e diversificando-se, devido ao avanço do conhecimento das técnicas de cultivo e aplicações comerciais para a biomassa gerada. O histórico dos cultivos de microalgas mostra claramente como a atividade vem crescendo e se diversificando pelo mundo (LOURENÇO, 2006).

As microalgas têm sido utilizadas na alimentação humana como fontes de suplemento alimentar de alto valor nutricional, na alimentação animal, extração de compostos bioativos, produção de cosméticos, fonte de pigmentos, ácidos graxos, fonte de biocombustíveis, como forma de fixar CO₂ atmosférico, tratamento de águas residuais, uso como indicadores ambientais, entre outros (BATISTA et al., 2013; CARVALHO, 2010; KOTHARI et al., 2013; LOURENÇO, 2006; MORAIS; RADMANN; COSTA, 2011; RADMANN; COSTA, 2008).

3.1.1 Microalga *Spirulina*

A microalga *Spirulina* (Figura 1) é uma cianobactéria filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, com 1 a 12 µm de diâmetro, e se dispõem na forma espiralada, com até 1 mm de comprimento. Através da fotossíntese a *Spirulina* converte os nutrientes do meio em material celular, liberando oxigênio (TOMASELLI, 1997).

Figura 1 - Microalga *Spirulina* (aumento de 40x).

Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica - FURG

A microalga *Spirulina* pode sofrer variações no crescimento de acordo com o meio de cultivo utilizado e as condições do meio externo (MULITERNO et al., 2005). O meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), cuja composição se encontra na Tabela 1, é muito utilizado no cultivo desta microalga.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk

Nutriente	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5*	1 mL.L ⁻¹
Solução B6**	1 mL.L ⁻¹

Fonte: Zarrouk (1966)

*Composição da Solução A5 (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄ 7H₂O: 0,222; CuSO₄.5H₂O: 0,079; NaMnO₄: 0,015.

**Composição da Solução B6 (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄.24 H₂O: 96; NiSO₄.76H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,1; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

A microalga *Spirulina* é muito estudada e utilizada para diversos fins, principalmente devido à sua composição química. Esta microalga apresenta em sua composição 38-70% de proteínas; 13-25% de carboidratos; 6-15% de lipídios e 6-9% de minerais (COLLA et al., 2007; HENRIKSON, 1994; MADKOUR; KAMIL; NASR, 2012).

As proteínas da *Spirulina* contêm todos os aminoácidos essenciais (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) que representam 47% do total das proteínas (DILLON; PHUN; DUBACQ, 1995).

A *Spirulina* apresenta parede celular constituída por mucopolissacarídeos, sendo uma vantagem do ponto de vista de preservação da integridade de componentes como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados, uma vez que dispensa o uso de calor para disponibilizar os nutrientes (TOMASELLI, 1997).

As vitaminas que podem estar presentes na *Spirulina* são a biotina, o ácido fólico, as vitaminas B12, B6, B3, B2, B1 e E, além do ácido pantotênico. A quantidade de vitamina E presente é de aproximadamente 190 mg.kg⁻¹ de *Spirulina* (RICHMOND, 1990).

Os minerais presentes em maior quantidade na *Spirulina* são cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio e zinco. Esta microalga possui também alto conteúdo de pigmentos e de outros micronutrientes indispensáveis (BRANGER et al., 2003).

Dentre os pigmentos, destaca-se a ficocianina que representa cerca de 120-140 mg.g⁻¹ de biomassa seca (ERIKSEN, 2008). Outro pigmento é o β -caroteno que representa cerca de 80% dos carotenóides presentes em sua biomassa (COHEN, 1997).

A biomassa da microalga *Spirulina*, por ser segura para uso (*Generally Recognized as Safe* - GRAS), pode ser utilizada nas áreas de alimentos, farmacêutica e médica (BRASIL, 2009; FDA, 2002; MENDONÇA; DRUZIAN; NUNES, 2012). Vários estudos têm sido realizados evidenciando os efeitos terapêuticos desta microalga, que incluem sua utilização na prevenção de certos tipos de cânceres (HIRAHASHI et al., 2002), efeito protetor contra diabetes e obesidade (ANITHA; CHANDRALEKH, 2010) e atividade antioxidante (MIRANDA et al., 1998).

Além disso, tem sido utilizada na produção de biomassa proteica (ANDRADE; COSTA, 2008), ácidos graxos (SAJILATA; SINGHAL; KAMAT, 2008), pigmentos (MARTELLI et al., 2014); na biofixação de CO₂ atmosférico (MORAIS; COSTA, 2007); em processos de remoção de metais pesados de efluentes (PANE et al., 2008) e na produção de biodiesel (NAUTIYAL; SUBRAMANIAN; DASTIDAR, 2014).

3.2 Condições de cultivo de microalgas

As microalgas possuem capacidade de se adaptar a diversos ambientes, podendo ajustar ou alterar sua estrutura interna para excretar uma gama de compostos. Podem alterar seu metabolismo como resposta às mudanças das condições ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

O crescimento de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. A composição bioquímica da biomassa das microalgas é determinada pela natureza de cada espécie algal e de fatores como a intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação do meio de cultivo (MIAO; WU, 2004).

Altas intensidades de luz no cultivo de microalgas podem conduzir a dois fenômenos desfavoráveis ao crescimento. A fotoinibição, a qual ocorre quando o fluxo de fótons absorvido nos tilacóides provoca uma concentração excessiva de elétrons de alta energia na célula para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Estes elétrons de alta energia reagem com água e formam peróxido de hidrogênio, tóxico às células (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004). A fotolimitação é outro fenômeno desfavorável que ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam nas camadas mais profundas do meio de cultivo (MOHANTY; SRIVASTAVA; KRISHNA, 1997).

A temperatura tem grande importância em processos metabólicos de todos os seres vivos, pois esses processos são regidos por estruturas e compostos que dependem da velocidade das reações químicas associadas, sendo que para cada conjunto de reações existe uma temperatura ideal. Além disso, o aumento na temperatura provoca aceleração da velocidade de reação (SADAVA et al., 2009). A temperatura pode influenciar o crescimento celular e a composição química das microalgas. No gênero *Spirulina*, segundo Colla et al. (2007), a temperatura de 35°C tem efeito negativo na produção de biomassa, porém apresenta efeito positivo na produção de proteínas, lipídios e compostos fenólicos, sendo obtidas alta concentração celular e produtividade a 30°C.

O controle do pH é essencial para que os componentes do meio de cultura possam ser efetivamente absorvidos, afetando diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos. O crescimento de microalgas em cultivo envolve o consumo de CO₂ dissolvido no meio, aumentando o pH do sistema, que pode atingir níveis muito elevados e tóxicos para muitas espécies (LOURENÇO, 2006). Para a microalga *Spirulina*, quanto maior o pH do meio, mais facilmente o CO₂ é assimilado e convertido em HCO₃⁻ e CO₃²⁻. Com pH acima de 11,0 não ocorre o crescimento da *Spirulina*, que pode ser devido ao efeito da grande

alcalinidade sobre os processos metabólicos, além da possibilidade da ocorrência de precipitação de carbonato, que segue por floculação ou sedimentação da microalga (BINAGHI et al., 2003).

Para produção de biomassa com determinadas características desejadas, a composição do meio de cultivo é um fator fundamental, o que pode afetar a taxa de crescimento e a produção de biomassa. A deficiência de nutrientes no meio pode fazer com que a microalga adapte seu metabolismo à nova condição. Em geral, as modificações no meio mudam a composição bioquímica da biomassa, principalmente a composição de proteínas, lipídeos e pigmentos (CAMPO; GONZÁLEZ; GUERRERO, 2007).

O nitrogênio apresenta grande importância para as microalgas por ser constituinte de diversas substâncias estruturais da célula, como proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas) (LOURENÇO, 2006). Grande variedade de compostos nitrogenados, orgânicos e inorgânicos, pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para o cultivo de microalgas, devido a grande habilidade que estas possuem para utilizar nitrato, nitrito ou amônia (RICHMOND, 1990).

Quando a fonte de nitrogênio apresenta-se na forma de nitrato, a microalga realiza gastos celulares energéticos para reduzir esse íon a nitrito através da enzima nitrato-redutase. Posteriormente, ocorre outra redução pela nitrito-redutase gerando a amônia, sendo a forma de nitrogênio utilizada pela alga em seu metabolismo (CORNET; DUSSAP; GROS, 1998).

O nitrogênio, importante elemento para o metabolismo das microalgas, contribui para a formação de proteínas, porém, quando se realiza técnicas de limitação deste nutriente nos cultivos, o conteúdo de proteína pode ser convertido a compostos de armazenamento de energia, como carboidratos e lipídios (HU, 2004).

Macedo e Alegre (2001) verificaram a influência do teor de nitrogênio na produção de lipídios no cultivo de *Spirulina máxima*. Foi observado aumento de aproximadamente 3 vezes no conteúdo de lipídios quando utilizado menor concentração de nitrogênio.

Colla et al. (2007) avaliaram a influência da concentração de nitrogênio e da temperatura no teor de proteínas e lipídios e no crescimento celular de *Spirulina platensis*, sendo esta cultivada em meios com 4 diferentes concentrações de nitrato de sódio (0,6 a 2,5 g.L⁻¹), nas temperaturas de 30 e 35°C. O aumento da concentração da fonte de nitrogênio e da temperatura levou a um aumento no teor lipídico e protéico, enquanto que a menor temperatura favoreceu o crescimento celular. Os autores sugeriram que nos cultivos realizados a 35°C, a baixa concentração de biomassa possibilitou uma maior disponibilidade

de luz para as células, permitindo uma melhor utilização do nitrogênio, e conseqüentemente maior produção de lipídios e proteínas nos cultivos realizados com maiores concentrações de nitrato de sódio.

Costa et al. (2001) estudaram no cultivo de *Spirulina platensis* diferentes fontes de nitrogênio, como nitrato de sódio, nitrato de amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio e uréia, sendo os melhores resultados em termos de concentração de biomassa encontrados quando foi utilizado nitrato de sódio.

O fósforo é um nutriente essencial que desempenha um papel importante em processos metabólicos celulares, formando muitos componentes estruturais e funcionais necessários para o crescimento de microalgas, pois participa na transferência de energia intracelular, síntese de ácidos nucléicos e reações especiais associadas com divisão celular (KAPLAN et al., 1990).

Markou (2012) verificou que a quantidade de fósforo existente no meio de cultura alterou a composição de biomassa de *Spirulina*, pois a redução de K_2HPO_4 no meio de cultivo causou aumento na concentração de carboidratos e lipídios e redução na concentração de proteínas.

Outro fator importante no cultivo das microalgas é a agitação, a qual pode influenciar o crescimento celular. A agitação tem por finalidade impedir a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células, permitir a captação de CO_2 da atmosfera, facilitar a transferência de O_2 da fase gasosa para o meio líquido e diminuir os gradientes gasosos no meio (GRIMA et al., 1996; JIMENEZ et al., 2003).

3.3 Surfactantes e biosurfactantes

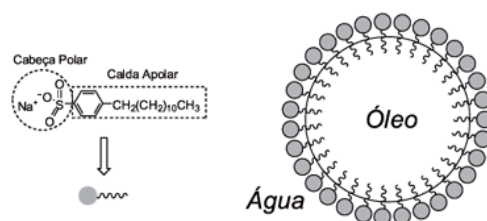
Os surfactantes são compostos anfipáticos, que possuem um grupo hidrofílico (polar) e um grupo hidrofóbico (apolar) na mesma molécula. Estes compostos tendem a distribuir-se nas interfaces entre as fases fluidas ocasionando interação água/óleo ou óleo/água, proporcionando a formação de um filme molecular que reduz a tensão superficial e interfacial. Através dessas características os surfactantes apresentam propriedades únicas como detergência, capacidade de dispersão de fases, emulsificação, formação de espuma, lubrificação, molhabilidade e solubilização (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são compostos tensoativos que podem ser produzidos extracelularmente ou fazem parte da membrana celular de micro-organismos (MULLIGAN, 2005) e apresentam as mesmas características surfactantes dos produzidos sinteticamente, tais como diminuição da tensão superficial e alta capacidade emulsificante (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A água, por exemplo, tem alta tensão superficial em função das forças de atração entre suas moléculas. Quando um tensoativo é dissolvido neste líquido, migra para a superfície, devido as suas características anfipáticas, ocasionando uma separação parcial entre as moléculas, com isso, as forças de atração entre as moléculas da superfície diminuem acarretando na diminuição da tensão superficial do fluido (DALTIM, 2011).

Com adições sucessivas de surfactante, atinge-se um nível, sobre o qual não se verifica mais significativa redução da tensão superficial. A partir dessa concentração de surfactante, começa a haver a associação das moléculas anfipáticas na forma micelas (Figura 2). Este valor é conhecido como concentração micelar crítica (CMC) (MULLIGAN, 2005).

Figura 2 – Representação do dodecilbenzenossulfonato de sódio e de uma micela.



Fonte: Rinaldi et al. (2007).

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

- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e no tratamento de resíduos (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; WHANGA et al., 2008);

- Baixa toxicidade: devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, os biossurfactantes possuem baixa toxicidade, permitindo o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002);

- Substratos abundantes e de baixo custo: podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo, disponíveis em grande quantidade (RAHMAN et al., 2002);

- Elevada eficácia em condições extremas: em condições de elevada temperatura, salinidade ou variações de pH, os biossurfactantes geralmente não perdem sua capacidade de emulsificar ou de reduzir a tensão superficial. Alguns biossurfactantes e suas atividades superficiais não são afetados por temperaturas até 90°C. Além disso, são capazes de suportar concentração de até 10% de NaCl, enquanto uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes químicos convencionais (BOGNOLO, 1999);

- Maior eficiência e efetividade: os biossurfactantes são mais efetivos e eficientes na redução das tensões superficial e interfacial que surfactantes sintéticos, pois propiciam menores tensões em menor concentração de surfactante (BOGNOLO, 1999).

Estruturalmente os biossurfactantes apresentam combinações diversas, em sua grande maioria são lipídios, os quais apresentam uma estrutura típica de surfactante. A porção lipofílica dos lipídios normalmente é um hidrocarboneto com um ou mais ácidos graxos, os quais podem ser saturados, insaturados ou conter estruturas cíclicas. A porção polar do biossurfactante pode ser simples (carbonila, hidroxila) ou uma mistura complexa de fosfatos, carboidratos, aminoácidos, dentre outros (LANG, 2002).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química da molécula e com o micro-organismo produtor, compreendendo uma ampla variedade de estruturas químicas como glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, lipídios neutros, ácidos graxos e fosfolipídios (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

As microalgas são produtoras de compostos como glicolipídios, fosfolipídios e lipídios neutros (BIGOGNO et al., 2002; MENDES; REIS; PALAVRA, 2006; XUE et al., 2002). Segundo Borowitzka (1988), dentre as microalgas, as maiores produtoras de glicolipídios e fosfolipídios são as cianobactérias e as clorofíceas, respectivamente.

Segundo XUE et al. (2002) os glicolipídios são os maiores componentes lipídicos das membranas das cianobactérias. Estes mesmos autores estudaram a composição de glicolipídios da microalga *Spirulina platensis*, e os resultados mostraram 28,2% de glicolipídios do total lipídico.

Os fosfolipídios encontram-se presentes em todos os micro-organismos, havendo poucos exemplos de produção extracelular. Mendes, Reis e Palavra (2006) estudando a extração do ácido γ -linolênico de *Spirulina*, obtiveram rendimentos diferentes para lipídios neutros, glicolipídios e fosfolipídios, dependendo do solvente que foi utilizado. Os resultados

demonstraram, em relação à concentração de lipídios, até 27,5% de fosfolipídios e 52% de glicolipídios quando foi utilizado clorofórmio, metanol e água.

Biossurfactantes de baixa massa molecular são geralmente glicolipídios e lipopeptídios, e são muito efetivos na redução das tensões superficial e interfacial. Biossurfactantes de alta massa molecular são normalmente polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídios e lipoproteínas, caracterizando-se como importantes formadores de emulsões (RON; ROSENBERG, 2001).

3.3.1 Produção de biossurfactantes

Nos micro-organismos, os biossurfactantes são compostos produzidos por reações de metabolismo secundário apresentando funções como mobilidade e adesão celular, diferenciação, acessibilidade aos substratos e como moléculas de armazenamento de carbono e energia (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006).

A cinética de produção de biossurfactantes por micro-organismos pode ser classificada através da produção associada ao crescimento, sob condições de limitação do crescimento, por células imobilizadas ou com a suplementação de um precursor (DESAI; BANAT, 1997).

A produção associada ao crescimento ocorre quando há relação entre o crescimento, a utilização do substrato e a produção do biossurfactante. Neste caso, a produção do biossurfactante ocorre durante a fase exponencial de crescimento do micro-organismo. A produção em condições de limitação do crescimento caracteriza-se pelo aumento da concentração de biossurfactantes como resultado da limitação de uma ou mais fontes de nutrientes do meio de cultivo (DESAI; BANAT, 1997).

No caso de produção por células imobilizadas não há multiplicação celular. As células, todavia, continuam a utilizar fontes de carbono para a produção de biossurfactantes. A adição de precursores ao meio de cultivo pode ocasionar modificações qualitativas e quantitativas na produção de biossurfactantes. A suplementação pode ser de substratos lipofílicos ou hidrofílicos (DESAI; BANAT, 1997).

Apesar de haver muitos estudos referentes à produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos não há registros na literatura de trabalhos realizados com microalgas, sendo um dos únicos encontrados desenvolvido por Radmann (2011). Segundo Fontes, Amaral e Coelho (2008), a quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos por diversas espécies de micro-organismos são influenciadas tanto pela fonte de carbono

quanto pelas concentrações de nitrogênio, fósforo, manganês e outros nutrientes, além das condições de cultivo como pH, temperatura e agitação.

A fonte de carbono influencia a síntese do biossurfactante, em alguns casos a adição de substratos imiscíveis ou miscíveis em água resulta na indução da produção de biossurfactante, porém, em outros, resulta em repressão. As fontes de carbono utilizadas para a produção de biossurfactante podem ser divididas em três categorias: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; KIM et al., 1997).

Radmann (2011) em estudo realizado com as microalgas *Synechococcus nidulans* LEB 25 e *Spirulina* sp. LEB 18, utilizando glicose como fonte de carbono, verificou redução da tensão superficial dos meios de cultivo de 70 mN.m^{-1} para 43 mN.m^{-1} indicando a produção de biossurfactantes pelas microalgas. Já Zinjarde e Pant (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não é viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo e alcanos detectou-se a produção de biossurfactante.

A síntese de alguns biossurfactantes também pode ser regulada pela concentração de nitrogênio e íons metálicos, ocorrendo somente após a exaustão destas fontes de nutrientes. O acúmulo de lipídios é favorecido quando no meio há um excesso da fonte de carbono sobre outros nutrientes limitantes (DESAI; DESAI, 1993).

Quando inicia a limitação de nutrientes a velocidade de crescimento decresce, mas o carbono continua sendo transportado para o interior das células e utilizado para a biossíntese de lipídios, sendo que os produtos finais formados nestas circunstâncias podem ser lipídios, polissacarídeos, polímeros de estocagem como o poli-hidroxibutirato ou antibióticos. Nutrientes limitantes que podem levar a estas condições são o nitrogênio, magnésio, ferro e fósforo (DESAI; DESAI, 1993).

Abouseoud et al. (2008), em estudo realizado com *Pseudomonas fluorescens*, onde utilizaram três fontes de nitrogênio (cloreto de amônio, nitrato de amônio e nitrato de sódio), verificaram que os melhores resultados na produção de biossurfactantes e no crescimento foram obtidos quando foi utilizado nitrato de amônio.

Segundo Kim et al. (2006) a levedura *Candida antarctica* cultivada em meio contendo íon amônio e peptona como fontes de nitrogênio, apresentou produção de glicolipídio quando ocorreu o esgotamento da fonte de nitrogênio. Também foi observado por Benincasa et al. (2002) que *Pseudomonas aeruginosa* LBI apresentou maior produção de biossurfactantes após o consumo total de nitrogênio, quando a cultura alcançou a fase estacionária de crescimento.

Em relação à fonte de fósforo, Kim et al. (1997), ao estudarem a produção e propriedades do lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* C9 verificaram uma maior produção do biossurfactante em concentrações mais altas de fosfato. Porém, Mulligan, Mahmoudides e Gibbs (1989) verificaram aumento na produção de biossurfactantes quando a fonte de fósforo no meio de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* foi limitada, devido a alterações enzimáticas no metabolismo celular.

Alguns micro-organismos modificam o pH do meio de cultivo durante seu crescimento, tornando necessária a inclusão de soluções tampão a fim de garantir que o pH mantenha-se dentro dos limites ótimos para crescimento e formação do produto que se deseja obter (FRANCO; LANDGRAF, 2008). De acordo com Desai e Banat (1997), o pH apresenta importância na produção de raminolipídios por *Pseudomonas*, sendo máxima em pH de 6,0 a 6,5 e diminuindo em pH acima de 7,0.

A maioria dos cultivos realizados para produção de biossurfactante ocorre em uma faixa de temperatura de 25 a 30°C (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Casas e Ochoa (1999) mostraram que as quantidades de soforolipídeo obtidas por *Candida bombicola* em ambas as temperaturas (25°C e 30°C) foram próximas. Já na produção de biossurfactantes a partir dos micro-organismos *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas* sp., Darvishi et al (2011) obtiveram melhores resultados em cultivo realizado a 40°C.

Outro fator importante é a agitação, pois é capaz de promover melhor aeração do meio, favorecendo o crescimento de micro-organismos aeróbios e facultativos. A agitação auxilia na dispersão dos nutrientes e em sua homogeneização, favorecendo o crescimento dos micro-organismos (SCHMIDELL et al., 2001).

O aumento da velocidade de agitação no cultivo pode ocasionar cisalhamento na parede celular do micro-organismo ou aumento da taxa de transferência de oxigênio, isto irá depender tanto do reator utilizado quanto do micro-organismo (SCHMIDELL et al., 2001). Com isso, a velocidade de agitação é um parâmetro importante para a produção de biossurfactantes, que pode levar a redução da produção de biossurfactantes devido ao efeito de cisalhamento na parede celular, ou pode aumentar a produção com o aumento da taxa de transferência de oxigênio.

3.3.2 Métodos de extração

O primeiro passo na extração de biocompostos intracelulares é a ruptura das células microbianas. Os métodos de ruptura em escala laboratorial são classificados, de

acordo com a forma de desintegração celular, em mecânicos ou não mecânicos, sendo os primeiros mais utilizados por manterem a integridade química das substâncias contidas inicialmente nas células (GREENWELL et al., 2010).

Dentre os métodos de ruptura mecânico destacam-se o rompimento mecânico com esferas de vidro e a ultrassonicação, enquanto os não mecânicos incluem geralmente a lise celular com uso de ácidos, bases, enzimas ou choques osmóticos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MEDEIROS et al., 2008).

O rompimento manual com esferas de vidro é um método que não necessita de grande aparato operacional. Utiliza basicamente esferas de vidro e o procedimento consta da adição das mesmas em um tubo, contendo suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente por um tempo determinado e a ruptura celular ocorre pela força do atrito devido à moagem com pequenas esferas como abrasivos (MEDEIROS et al., 2008).

A ruptura celular por ultrassonicação ocorre quando, a uma elevada frequência e intensidade energética, uma sonda ultrassônica causa rápida cavitação e colisão das bolhas na solução (DOULAH, 1977). Embora as bolhas sejam bem menores que as células das microalgas, sua colisão cria pequenas regiões de pressões extremamente altas que podem romper a parede celular desses micro-organismos (SILVA, 2013).

A técnica de extração empregada na obtenção biocompostos influencia diretamente sua qualidade e sua composição final. O procedimento de extração é determinado pelo tipo de substância a ser extraída e se o objetivo é quantitativo ou qualitativo. As diferentes técnicas de extração podem estar baseadas em mecanismos químicos diferentes, como por exemplo, quando a solubilidade de substâncias no solvente utilizado é função de sua polaridade (TSAO; DENG, 2004).

Como os lipídios neutros estão ligados covalentemente, a extração destes compostos pode ser realizada por solventes apolares. Já os solventes orgânicos polares, extraem lipídios polares, pois são capazes de romper as associações entre lipídios e proteínas ao formarem ligações de hidrogênio com os lipídios polares no complexo (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Os solventes orgânicos (polares e apolares) penetram pela membrana até o citoplasma e interagem com o complexo lipídico. Durante esta interação, o solvente apolar circunda o complexo lipídico e faz associações de *van der Waals* com os lipídios neutros, enquanto os solventes polares formam ligações de hidrogênio com os lipídios polares. As ligações de hidrogênio são fortes o suficiente para deslocar as associações entre lipídios e proteínas que ocorrem entre o complexo e a membrana celular, formando-se então um

complexo solvente-lipídios que atravessa a membrana e sai da célula. Como resultado, os lipídios neutros são extraídos e ficam dissolvidos no solvente orgânico apolar e os lipídios polares dissolvidos no solvente polar (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Mendes, Reis e Palavra (2006), estudando a extração do ácido γ -linolênico de *Spirulina maxima*, utilizaram diferentes solventes. Esses autores relatam que clorofórmio, acetona e metanol extraem lipídios neutros, glicolipídios e fosfolipídios, respectivamente. Além disso, verificaram que entre os solventes autorizados na indústria de alimentos, etanol levou à maior extração de lipídios e de γ -linolênico.

Radmann (2011) em estudo visando a seleção de microalgas para produção de biossurfactantes, obteve melhores respostas para as microalgas *Tetraselmis suecica* OR, *Scenedesmus* sp. 3PAV3 e *Chlorella* sp. PROD1, quando a extração foi realizada utilizando metanol e etanol como solvente.

3.3.3 Atividade biossurfactante

A redução da tensão superficial e interfacial dos sistemas é um bom indicativo da produção de biossurfactantes. A tensão superficial pode ser definida como a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície. Devido à presença de surfactantes, uma menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida. Por exemplo, um bom surfactante permite baixar a tensão superficial da água de 72 para 35 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ e a tensão interfacial entre a água e n-hexadecano de 40 para 1 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. O conhecimento da concentração micelar crítica (CMC) também é utilizado para medir a eficiência de um surfactante (MULLIGAN, 2005).

O balanço hidrofílico lipofílico (BHL) é uma expressão numérica relativa da atração simultânea do emulsificante pela água e pelo óleo, cujo valor informa a solubilidade do emulsificante em óleo ou água. Em geral, as moléculas com baixo BHL são lipofílicas, enquanto as de BHL alto são mais solúveis em água (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

A capacidade dos biossurfactantes de formar emulsões geralmente é determinada pelo índice de emulsificação. Uma das técnicas de avaliar a atividade emulsificante foi desenvolvida por Cooper e Goldenberger (1987) e baseia-se no índice de emulsificação. O índice de emulsificação é mensurado através da porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido (cm). Para uma emulsão ser considerada estável o índice de emulsificação após 24 h deve ser superior a 50%.

3.3.4 Aplicações de biossurfactantes

Os biossurfactantes têm sido objeto de investigação, por serem possíveis substitutos para os surfactantes sintéticos e apresentar potencial de aplicação industrial e ambiental relacionado com as propriedades de emulsificação, formação de espuma, detergência, dispersão e solubilização de compostos hidrofóbicos (DASTGHEIB et al., 2008). Os biossurfactantes vêm apresentando aplicações em indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentos, bem como na biorremediação, entre outros (MARCHANT; BANAT, 2012).

Do ponto de vista ambiental, os biossurfactantes são mais aceitáveis para o processo de biorremediação, tanto no mar quanto na terra (CAMEOTRA; MAKKAR, 2010). Como os biossurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por micro-organismos e promovem a biorremediação de águas e solos (MARTI et al., 2014; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Na área medicinal os biossurfactantes estão sendo utilizados devido a suas comprovadas atividades antibacterianas, antifúngicas, antiviral e antitumoral (GUDINA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2006).

Dentre as possíveis aplicações dos biossurfactantes na indústria de alimentos, a formação de emulsões é uma das principais. A formação de emulsões estáveis depende do equilíbrio entre as fases, óleo em água ou água em óleo. Neste sentido, os biossurfactantes de elevada massa molecular são melhores emulsificantes do que os de baixa massa molecular, em especial os lipopeptídios e lipopolissacarídeos (NITSCHKE; COSTA, 2007).

3.4 Formação de nanoemulsões

As nanoemulsões são dispersões de pelo menos dois líquidos imiscíveis (FERNANDEZ et al., 2004). As emulsões, microemulsões e nanoemulsões são compostas por uma fase oleosa, uma fase aquosa e um surfatante (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003).

A estrutura das nanoemulsões consiste em gotículas da fase dispersa (ou interna) envolta pela fase contínua (ou externa). As nanoemulsões simples podem ser classificadas como água em óleo (A/O), quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas numa fase contínua oleosa, ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas numa fase contínua aquosa (FORGIARINI et al., 2001).

Segundo Capek (2004) o termo nanoemulsões é utilizado para definir emulsões com fase interna de gotas menores que 1000 nm, sendo transparentes ou translúcidas quando

apresentam granulometria menor que 200 nm e de aparência leitosa acima de 200 nm. Porém, não há uma concordância em relação ao termo que deve ser utilizado de acordo com o tamanho das gotas, pois Koroleva e Yurtov (2012) afirmam que é mais correto aplicar o termo nano somente para sistemas dispersos com tamanho de gota menor que 100 nm.

Para a formação de nanoemulsões é necessário fornecimento de energia ao sistema. De acordo com a literatura, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta ou baixa energia (PEY et al., 2006). Os métodos de baixa energia mais utilizados incluem o método de temperatura de inversão de fases, o ponto de inversão da emulsão e o método de emulsificação espontânea (KOROLEVA; YURTOV, 2012). Os métodos de alta energia são realizados pelo emprego de homogeneizadores de alta velocidade, homogeneizadores de alta pressão e homogeneizadores ultrassônicos (ANTON, BENOIT, SAULNIER, 2008).

O Ultraturrax® é um homogeneizador de alta velocidade. Um eixo externo cisalha, por impacto, as partículas de uma dispersão por meio de uma hélice que gira em alta rotação em um eixo interno. Esse tipo de homogeneizador produz um fluxo turbulento que provoca a ruptura das gotículas; o menor tamanho de gota que pode ser obtido depende da geometria da hélice e do recipiente onde a mistura é feita, e do número de passagens da emulsão na zona de mistura (OUZINEB et al., 2006).

3.4.1 Estabilidade de nanoemulsões

Devido ao tamanho reduzido das gotas as nanoemulsões são mais estáveis que as macroemulsões, pois as gotículas menores apresentam menor tendência a cremação. O fenômeno de coalescência também é reduzido, visto que o tamanho diminuto das gotículas previne a sua deformação. Nas nanoemulsões, a principal causa de instabilidade é a chamada maturação de Ostwald. Este processo ocorre em nanoemulsões polidispersas devido à diferença de solubilidade entre os diversos tamanhos de gotas, que ocasiona a migração das menores para o interior das gotas maiores (TADROS et al., 2004).

Segundo Robins (2000) a cremação pode ocorrer quando a fase dispersa é mais densa que a contínua, com isso as gotículas menos densas tendem a ir ao topo, formando assim uma camada de emulsão mais concentrada. Já a coalescência ocorre devido ao aumento das forças de interação entre as gotículas dispersas, resultantes da diminuição da repulsão eletrostática (CAPEK, 2004). Desta maneira a medida do potencial zeta representa uma ferramenta útil no acompanhamento da estabilidade do sistema ao longo do tempo.

O potencial zeta pode ser definido como a diferença de potencial entre a superfície de íons fortemente ligados ao redor da gotícula e uma região neutra da solução. Quando o potencial zeta apresenta valores iguais ou maiores que 30 mV, em módulo, as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, fazendo com as gotículas fiquem dispersas no sistema, garantindo estabilidade eletrostática da emulsão. Com isso, tem-se menor tendência à floculação e coalescência. Por outro lado, quando o potencial zeta é baixo, as forças atrativas predominam em relação às repulsivas, favorecendo a aproximação das partículas e conseqüentemente a instabilidade da emulsão, podendo ocorrer maturação de Ostwald e posterior separação de fases (AULTON, 2005; ROLAND et al., 2003).

O valor do pH também é um importante parâmetro de monitoramento da estabilidade de nanoemulsões. Alterações neste parâmetro indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final (MARTINI, 2005).

Outro método útil para avaliar a estabilidade de uma nanoemulsão consiste na mensuração do tamanho das gotas da fase interna da nanoemulsão. Medidas do tamanho das gotas após o preparo e durante o período de armazenamento fornecem uma indicação da estabilidade do sistema, pois quanto mais rápido as gotas aumentam de tamanho, menor é a estabilidade devido à possibilidade de ocorrer coalescência e maturação de Ostwald (OLIVEIRA, 2008; TADROS et al., 2004).

Aumentando-se a velocidade de agitação, existe uma tendência à diminuição do tamanho de gotículas formadas e a maior uniformidade de distribuição de tamanho. Da mesma forma, o aumento no tempo de agitação ocasiona tamanho de gotícula e polidispersão menores (COLOMBO et al., 2001). Aumentando-se a velocidade e o tempo de agitação tem-se o aumento de energia no sistema, ocasionando alta tensão de cisalhamento, cujo processo consiste na formação, deformação e ruptura das gotículas macrométricas iniciais, seguido da adsorção do tensoativo na interface das gotículas (FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004). Com isso, a diminuição do tamanho da gotícula também pode ser obtida com o aumento da concentração do agente estabilizador (GALINDO-RODRIGUES et al., 2004).

CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para melhor compreensão dos resultados, este trabalho foi dividido em 3 etapas. A primeira etapa e o cultivo da microalga realizado na segunda etapa foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica na Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, o restante da segunda parte e a terceira etapa foram desenvolvidas no Polytechnic Institute of New York University, New York, USA e Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, USA. Sendo elaborados 3 artigos:

1- Avaliação da influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo no cultivo e na produção de biossurfactantes pela microalga *Spirulina*;

2 - Formação de nanoemulsões a partir de extratos oriundos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produzida em escala piloto;

3 - Capacidade emulsificante de extratos obtidos a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52.

ARTIGO I - Avaliação da influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo no cultivo e na produção de biossurfactantes pela microalga *Spirulina*

Avaliação da influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo no cultivo e na produção de biossurfactantes pela microalga *Spirulina*

RESUMO

A microalga *Spirulina* é uma cianobactéria de reconhecido potencial nutricional e devido a sua diversificada composição vem sendo estudada para produção de diversos compostos. Biossurfactantes são moléculas anfipáticas de origem microbiana que reduzem tensões superficiais e interfaciais. Devido à biodegradabilidade e baixa toxicidade apresentada por estes compostos são potenciais substitutos de surfactantes sintéticos. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos nutrientes fósforo e nitrogênio no cultivo e na produção de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18. Para isso foram realizados experimentos utilizando Delineamento Fatorial Completo 2² visando avaliar a influência dos nutrientes fósforo e nitrogênio sobre a concentração máxima de biomassa e produtividade máxima nos cultivos, bem como sobre os extratos oriundos das microalgas através de medidas de tensão superficial. A extração de biossurfactantes foi realizada utilizando metanol como solvente. *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou melhores resultados de produção de biomassa quando em comparação com as microalgas *Spirulina platensis* Paracas e *Spirulina* sp. LEB 18. As variáveis fósforo e nitrogênio não apresentaram influência significativa na concentração máxima e produtividade máxima de *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18. Já para a microalga *Spirulina platensis* Paracas, verificou-se dentre os cultivos realizados desta microalga, o que proporcionou maior valor de concentração máxima de biomassa (0,95 g.L⁻¹) e produtividade máxima (0,191 g.L⁻¹.d⁻¹) foi realizado com 114 mg.L⁻¹ de fósforo e sem adição de nitrogênio. A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 mostrou-se mais propícia para produção de biossurfactantes em relação às demais cepas de *Spirulina*, pois apresentou extrato com medida de tensão superficial de 31,2 mN.m⁻¹ em cultivo realizado com maior concentração de nitrogênio (412 mg.L⁻¹) e sem adição de fósforo. Com isso, este extrato apresenta potencialidade de aplicação na área de alimentos, como estabilizante, antimicrobianos, entre outras.

Palavras-chave: biomassa, cianobactéria, tensoativo.

ABSTRACT

The *Spirulina* microalga is a cyanobacterium which present recognized nutritional potential and because of its diverse composition has been studied for the production of a lot of compounds. Biosurfactants are amphipathic molecules of microbial origin that reduce surface and interfacial tensions. Due to the biodegradability and low toxicity displayed by these compounds are potential substitutes for synthetic surfactants. The objective of this work was to verify the influence of phosphorus and nitrogen in cultivation and biosurfactants production by microalgae *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 and *Spirulina* sp. LEB 18. For this, the experiments were performed using Full Factorial Design 2^2 to evaluate the influence of the nutrients phosphorus and nitrogen on the maximum biomass concentration and maximum productivity in the cultivates, as well as in extracts derived from microalgae through surface tension measurements. The extraction of biosurfactants was performed with methanol as solvent. *Spirulina platensis* LEB 52 provided higher biomass production when compared with the microalgae *Spirulina platensis* Paracas and *Spirulina* sp. LEB 18. The variables phosphorus and nitrogen showed no significant influence on the maximum biomass concentration and maximum productivity of *Spirulina platensis* LEB 52 and *Spirulina* sp. LEB 18. Already for microalgae *Spirulina platensis* Paracas, it was found among the cultures performed, which provided greater value of maximum biomass concentration (0.95 g L^{-1}) and maximum productivity ($0.191 \text{ gL}^{-1}.\text{d}^{-1}$) was conducted with 114 mg.L^{-1} of phosphorus and without addition of nitrogen. The *Spirulina* sp. LEB 18 showed was more favorable for the production of biosurfactants in relation to strains of *Spirulina platensis*, because presented extract with measure surface tension of 31.2 mN.m^{-1} in culture performed with higher concentrations of nitrogen (412 mg.L^{-1}) and without adding phosphorus. Thus, this extract has potential application in the food industry as a stabilizer, antimicrobial, among others.

Keywords: biomass, cyanobacterium, surfactant.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia microalgal tem sido utilizada como fonte de produtos alimentícios, farmacêuticos, bioquímicos, fertilizantes e como fonte de energia (BATISTA et al., 2013; DERNER et al., 2006; KOTHARI et al., 2013; SUN; WANG; ZHOU, 2012).

A microalga *Spirulina* é muito estudada e utilizada para diversos fins, principalmente devido à sua composição química. Esta microalga apresenta em sua constituição 38-70% de proteínas; 13-25% de carboidratos; 6-15% de lipídios e 6-9% de minerais (COLLA et al., 2007; HENRIKSON, 1994; MADKOUR; KAMIL; NASR, 2012). Além disso, a *Spirulina* apresenta vantagem de ser segura para uso (*Generally Recognized as Safe* - GRAS) o que permite sua utilização em indústrias alimentícias sem risco à saúde (BRASIL, 2009; FDA, 2002).

Como os demais micro-organismos, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. A manipulação das condições de cultivo, a presença, ausência ou concentração de determinados nutrientes, tendem a estimular a biossíntese de compostos que vão desde alimentos a fármacos (BRENNAN; OWENDE, 2010; MARKOU, 2012; SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003), além de influenciar os resultados de crescimento celular podem ocorrer alterações nos componentes da biomassa, como pigmentos, proteínas, lipídios, entre outros (DERNER, 2006).

As microalgas são produtoras de compostos como glicolípídios, fosfolípídios e lipídios neutros (BIGOGNO et al., 2002; MENDES; REIS; PALAVRA, 2006; XUE et al., 2002), os quais são classificados como biossurfactantes (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Surfactantes sintetizados por micro-organismos através de processos biológicos são denominados biossurfactantes. Estes consistem em substâncias compostas por uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica que atuam como agentes de superfície ativa capazes de reduzir a energia livre do sistema e por consequência reduzem a tensão superficial e interfacial (MULLIGAN, 2005).

Em função de suas características os biossurfactantes são adequados para diversas aplicações, como: detergentes, emulsificantes, antimicrobianos e agentes espumante. Devido a estas inúmeras aplicabilidades os biossurfactantes estão presentes em vários setores industriais como têxteis, cosméticos, farmacêuticos, alimentícios, produção de papel, polímeros e plásticos (NGUYEN et al., 2010; RAZA et al., 2014; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens quando comparados com surfactantes de origem petroquímica, como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, menor concentração micelar crítica, atividade antimicrobiana, além de serem produzidos de forma mais branda, a partir de processos fermentativos, e haver a possibilidade de produção a partir de recursos renováveis (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002, KOSARIC, 2001), sendo desse modo potenciais substitutos para os surfactantes sintéticos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência dos nutrientes fósforo e nitrogênio no cultivo e na produção de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos e condições de cultivo

As microalgas *Spirulina platensis* Paracas, *Spirulina platensis* LEB 52 (COSTA et al. 2001) e *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), pertencentes à Coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foram mantidas em meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966).

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubulares (2 L) e realizados de acordo com Delineamento Fatorial Completo 2^2 com triplicata no ponto central, sendo o nível inferior representado pelo meio de cultivo que não teve adição de fósforo e nitrogênio, o nível central por 50% da concentração de fósforo e nitrogênio contidos no meio Zarrouk e o nível superior representado por 100% da concentração de fósforo e nitrogênio contidos no meio Zarrouk (Tabela 1).

Tabela 1 – Níveis reais e codificados das variáveis fósforo (P) e nitrogênio (N) para os cultivos das microalgas.

Variável (mg.L ⁻¹)	Níveis codificados		
	-1	0	+1
P	0	57	114
N	0	206	412

A partir do delineamento experimental foi avaliada a influência da concentração dos componentes fósforo e nitrogênio, presentes no meio de cultivo, sobre a concentração

máxima de biomassa e produtividade máxima nos cultivos, como também nos extratos oriundos da biomassa das microalgas por meio da medida da tensão superficial.

Os ensaios foram realizados a 30°C, com iluminância de 41,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (fotoperíodo 12 h claro/escuro) e com agitação contínua por meio de injeção de ar estéril a 0,07 vvm por bombas de diafragma. A concentração de biomassa inicial dos cultivos foi 0,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ao final dos cultivos, a biomassa microalgal foi separada por centrifugação (9205 g por 10 min) (CR 22GIII, Hitachi), congeladas durante 24 h a -70°C e liofilizadas durante 48 h.

2.2 Crescimento celular

A concentração de biomassa da microalga foi determinada a cada 24 h através de medida de densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro (Quimis, Q798DRM) (COSTA et al., 2002), utilizando-se uma relação pré-estabelecida entre massa seca de biomassa e absorvância. O pH das culturas foi determinado diariamente em pHmetro digital (Q400HM, Quimis). Diariamente foi também avaliada a produtividade máxima de biomassa, sendo a produtividade obtida segundo a equação 1 (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (1)$$

Onde:

X_t = concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no tempo t (d),

X_0 = concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no tempo t_0 (d).

2.3 Determinação de nitrogênio e fósforo

A cada 48 h foram determinadas as concentrações de fósforo e nitrogênio no meio de cultivo dos diferentes experimentos. A concentração de fósforo foi determinada através de análise colorimétrica (PhosVer 3, Hach, USA) e a concentração de nitrogênio foi determinada utilizando método colorimétrico proposto por Cataldo et al. (1975).

2.4 Extração de biossurfactantes das microalgas

A extração de biossurfactantes foi realizada utilizando-se metanol juntamente com a biomassa seca em agitador de tubos (10 min) contendo esferas de vidro, seguido de banho

ultrassônico (20 min), sendo estes procedimentos realizados 3 vezes. Após, as amostras foram submetidas à agitação constante em agitador rotatório a 160 rpm durante 5 h com 50 mL de metanol, sendo em seguida centrifugada (9205 g por 10 min) (CR 22GIII, Hitachi).

A evaporação do metanol foi realizada em rota-evaporador (Q344B, Quimis) a 60°C. Após remoção do metanol fez-se ressuspensão em água (0,1 g de biomassa seca para 7,5 mL de água destilada) e realizada centrifugação (9205 g por 10 min) (CR 22GIII, Hitachi), sendo o extrato obtido a partir da fração sobrenadante (RADMANN, 2011).

2.5 Atividade biossurfactante

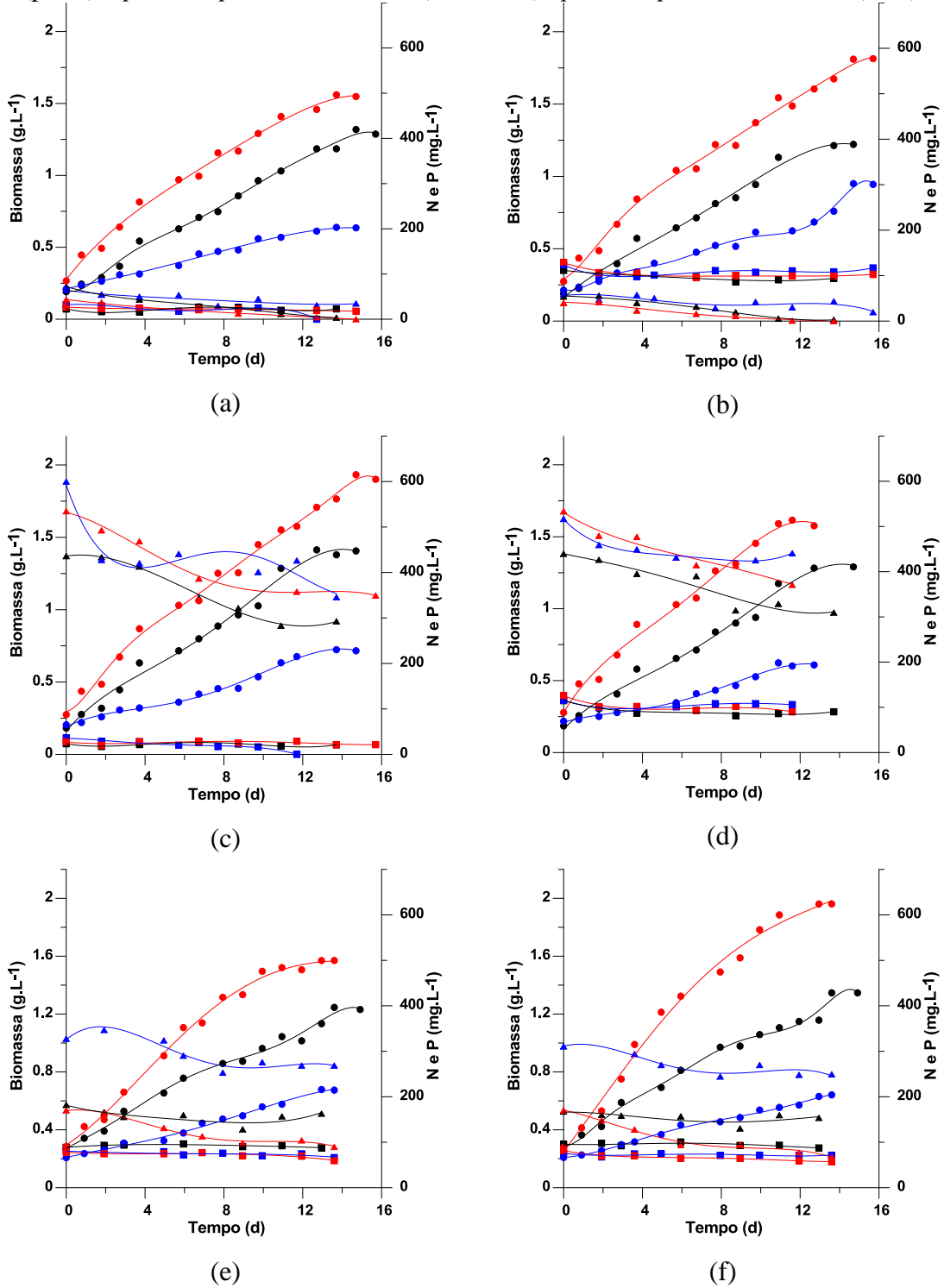
A atividade biossurfactante do extrato obtido foi realizada pela medida da tensão superficial com a amostra em contato com o ar, sendo esta realizada em tensiômetro (K-6, Kruss) utilizando o método do anel. Neste método, um anel metálico imerge na amostra a ser testada a uma determinada distância da superfície. O contato da amostra com o anel é desfeito, de maneira que o filme líquido produzido abaixo do anel é alongado, sendo determinada a força máxima necessária para a extensão do filme, obtendo-se a tensão superficial (RODRIGUES et al., 2006). A medida inicial da tensão superficial foi realizada utilizando-se água destilada, a qual apresenta valor de $72,0 \text{ mN.m}^{-1}$ (MULLIGAN, 2005).

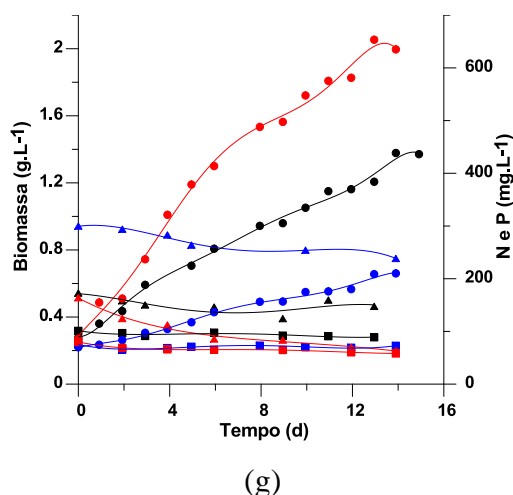
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as condições de cultivo realizadas para as diferentes microalgas não foi observada fase de adaptação celular (Figura 1). Segundo Lourenço (2006) a fase de adaptação pode não ser percebida quando as células inoculadas iniciam imediatamente o crescimento no meio de cultura novo, essa situação pode ocorrer se as diferenças entre as condições de cultivo do inóculo e do experimento não forem muito acentuadas. Além desses fatores Schmidell et al. (2001) relataram que a duração desta fase irá depender também da concentração do inóculo e de seu estado fisiológico.

Conforme observa-se na Figura 1, as microalgas apresentaram crescimento desde a inoculação, indicando que se adaptaram às novas condições de cultivo. Provavelmente este fato pode ter ocorrido devido ao inóculo ter sido mantido na mesma temperatura e luminosidade utilizada no experimento e também pela modificação no meio de cultura ter sido realizada somente nos componentes fósforo e nitrogênio. Os cultivos foram finalizados entre 13 e 16 d, quando as microalgas atingiram o final da fase exponencial de crescimento.

Figura 1- Concentração de biomassa (\circ), Nitrogênio (N) (\blacktriangle) e Fósforo (P) (\triangleleft) para os ensaios (a) sem adição de P e N, (b) 114 mg.L⁻¹ P e sem adição de N, (c) sem adição de P e 412 mg.L⁻¹ N, (d) 114 mg.L⁻¹ P e 412 mg.L⁻¹ N, (e) 57 mg.L⁻¹ P e 206 mg.L⁻¹ N, (f) 57 mg.L⁻¹ P e 206 mg.L⁻¹ N e (g) 57 mg.L⁻¹ P e 206 mg.L⁻¹ N para as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (preto), *Spirulina platensis* LEB 52 (vermelho) *Spirulina platensis* Paracas (azul).





Os cultivos realizados com *Spirulina platensis* Paracas apresentaram valores de pH entre 9,51 e 10,94, portanto estando na faixa de valores de pH ótimo para esta microalga, o qual segundo Vonshak (1997) está entre 9,5 e 10,5. O monitoramento do pH é importante pois a captação de CO₂ atmosférico pela microalga *Spirulina* depende do pH do meio de cultivo. Quanto maior o pH do meio, mais facilmente o CO₂ é dissolvido e convertido em HCO₃⁻ e CO₃²⁻ (BINAGHI et al., 2003).

A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou faixa de pH ao longo dos cultivos entre 9,66 e 11,43 e a *Spirulina* sp. LEB 18 entre 9,67 e 11,41. Ao final dos cultivos, ambas microalgas apresentaram valores de pH acima de 11, segundo Binaghi et al. (2003) neste momento o crescimento de *Spirulina* torna-se limitado, devido ao efeito da grande alcalinidade sobre os processos metabólicos, além da possibilidade da ocorrência de precipitação de carbonato, que segue por floculação ou sedimentação da microalga.

Em relação ao consumo de fósforo, nos cultivos em que não foram adicionados fonte de fósforo (Figuras 1a e 1c) a microalga *Spirulina platensis* Paracas consumiu completamente o fósforo restante, proveniente do inóculo utilizado. Já nos demais cultivos o fósforo apresentou uma redução entre 8,5% e 5,7% em relação à concentração inicial.

As microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18, nos cultivos sem adição de fósforo, consumiram 34,9% e 12,5% deste nutriente, respectivamente, em cultivo realizado sem adição de fonte de nitrogênio (Figura 1a). No cultivo realizado com 100% da fonte de nitrogênio (Figura 1c), o consumo de fósforo foi inferior, tendo sido 23,3% pela *Spirulina platensis* LEB 52 e 11,3% pela *Spirulina* sp. LEB 18.

O máximo consumo de fósforo verificado nos cultivos realizados com 100% e 50% da fonte de fósforo e nitrogênio (Figuras 1d, 1e, 1f e 1g) foi 21,4% pela *Spirulina* sp. LEB 18 e 29,9% pela *Spirulina platensis* LEB 52, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos em relação ao consumo de fósforo pelas microalgas nos diferentes cultivos, pode-se perceber que apenas a *Spirulina platensis* Paracas consumiu todo fósforo disponível no meio de cultivo realizado sem adição deste nutriente. Nos demais cultivos, as microalgas consumiram valores abaixo de 50% em relação à concentração inicial.

Este fato indica que a disponibilidade de fósforo presente no meio dos diferentes cultivos estava acima do que as microalgas necessitam para seu crescimento. De acordo com Kaplan et al. (1986) a quantidade de fósforo presente intracelularmente, pH e temperatura de cultivo podem influenciar o consumo de fósforo pelas microalgas.

O fósforo presente intracelularmente é armazenado sob a forma de grânulos de polifosfatos, ou como metafosfato no interior da célula. As microalgas podem utilizar esta reserva de fósforo para crescimento e/ou manutenção da população microbiana (SIGEE, 2005).

Em relação ao nitrogênio, nos cultivos de *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18 em que não foi adicionado este nutriente (Figuras 1a e 1b), ambas as microalgas consumiram todo nitrogênio que era proveniente do inóculo. Já em relação ao consumo deste nutriente pela *Spirulina platensis* Paracas houve redução entre 67,0% e 46,2% em relação à concentração inicial.

Nos cultivos realizados com adição de 100% da fonte de nitrogênio (Figuras 1c e 1d) o consumo deste nutriente por todas as microalgas foi inferior a 43% e em cultivos realizados com 50% da fonte de nitrogênio (Figuras 1e, 1f e 1g), o consumo máximo deste foi de 61,5% pela *Spirulina platensis* LEB 52.

Quando a fonte de nitrogênio apresenta-se na forma de nitrato, a microalga realiza gastos celulares energéticos para reduzir esse íon a nitrito através da enzima nitrato-redutase. Posteriormente, ocorre outra redução pela nitrito-redutase gerando a amônia, sendo a forma de nitrogênio utilizada pela alga em seu metabolismo (CORNET; DUSSAP; GROS, 1998).

Von Rückert e Giani (2004) realizaram experimentos com a cianobactéria *Microcystis viridis* Lemmermann utilizando amônio e nitrato como fonte de nitrogênio. Os resultados demonstraram que o íon amônio foi removido completamente no décimo dia, enquanto que o íon nitrato permanecia ainda disponível.

Diante do exposto, verifica-se que a absorção de nitrato pelas microalgas acontece lentamente, o que foi observado neste estudo. Porém, mesmo com baixo consumo de nitrogênio as microalgas continuaram crescendo, indicando que pode ser utilizado meio de cultivo com menor concentração deste nutriente.

A Tabela 2 apresenta os resultados de concentração máxima de biomassa, produtividade máxima dos cultivos e tensão superficial dos extratos obtidos nos cultivos das microalgas. Conforme pode ser observado a microalga *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou melhores resultados de produção de biomassa quando em comparação com *Spirulina platensis* Paracas e *Spirulina* sp. LEB 18.

As concentrações de fósforo e nitrogênio utilizadas não tiveram influência significativa ($p > 0,10$) na concentração máxima de biomassa e produtividade máxima dos cultivos das microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18, indicando que ambas as microalgas se adaptaram as diferentes condições nutricionais nos cultivos. Segundo Lourenço (2006), as cianobactérias toleram grandes variações de temperatura, salinidade, pH e disponibilidade de nutrientes. Possivelmente, sua tolerância a variações ambientais está relacionada à condição de procarionte.

Dentre os cultivos realizados com a microalga *Spirulina platensis* Paracas, esta apresentou maior valor de concentração celular máxima ($0,95 \text{ g.L}^{-1}$) e produtividade máxima ($0,191 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) (Tabela 2), em cultivo realizado sem adição de nitrogênio e com 114 mg.L^{-1} de fósforo. Mesmo sem adição de nitrogênio no meio de cultivo, a *Spirulina platensis* Paracas apresentou maior valor de concentração máxima de biomassa e produtividade máxima, indicando que este nutriente não foi limitante para seu crescimento.

Segundo Sassano et al. (2007), em condições mínimas de nitrogênio no meio de cultivo, a microalga degrada ficocianina, que é utilizada como fonte reserva de nitrogênio. Colla et al. (2007), em estudo realizado com a microalga *Spirulina platensis*, também verificaram que a redução de nitrogênio no meio de cultivo Zarrouk não influenciou na produtividade de biomassa da microalga.

Tabela 2 - Concentração máxima de biomassa (X_{\max}), produtividade máxima (P_{\max}) dos cultivos e tensão superficial (TS) dos extratos obtidos nos cultivos realizados de acordo com Delineamento Fatorial Completo 2^2 com triplicata no ponto central.

Microalga	Ensaio	Variável		X_{\max} (g.L ⁻¹)	P_{\max} (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TS (mN.m ⁻¹)
		Fósforo (mg.L ⁻¹)	Nitrogênio (mg.L ⁻¹)			
<i>Spirulina platensis</i> Paracas	1	0 (-1)	0 (-1)	0,67	0,081	58,4
	2	114 (+1)	0 (-1)	0,95	0,191	58,0
	3	0 (-1)	412 (+1)	0,72	0,097	58,5
	4	114 (+1)	412 (+1)	0,62	0,096	56,3
	5	57 (0)	206 (0)	0,67	0,102	55,8
	6	57 (0)	206 (0)	0,64	0,100	55,5
	7	57 (0)	206 (0)	0,66	0,089	56,6
<i>Spirulina platensis</i> LEB 52	8	0 (-1)	0 (-1)	1,56	0,180	53,5
	9	114 (+1)	0 (-1)	1,81	0,198	51,8
	10	0 (-1)	412 (+1)	1,93	0,225	53,7
	11	114 (+1)	412 (+1)	1,61	0,213	52,6
	12	57 (0)	206 (0)	1,56	0,252	52,3
	13	57 (0)	206 (0)	1,96	0,239	52,0
	14	57 (0)	206 (0)	2,05	0,265	51,8
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	15	0 (-1)	0 (-1)	1,31	0,175	53,7
	16	114 (+1)	0 (-1)	1,22	0,188	54,3
	17	0 (-1)	412 (+1)	1,41	0,259	31,2
	18	114 (+1)	412 (+1)	1,29	0,235	31,6
	19	57 (0)	206 (0)	1,24	0,137	54,0
	20	57 (0)	206 (0)	1,34	0,189	55,1
	21	57 (0)	206 (0)	1,37	0,172	54,3

Em relação às respostas de tensão superficial, o extrato oriundo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 que apresentou menor valor (31,2 mN.m⁻¹) foi obtido em cultivo realizado sem adição de fósforo e com 412 mg.L⁻¹ nitrogênio. De acordo com este resultado verifica-se a potencialidade desta microalga para produção de biossurfactantes, pois segundo Batista et al. (2006), o critério utilizado para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes é a habilidade em reduzir a tensão superficial da água abaixo de 40 mN.m⁻¹.

A partir dos resultados obtidos através do Delineamento Fatorial Completo 2² com triplicata no ponto central para *Spirulina platensis* Paracas foi realizada análise de variância para as respostas concentração máxima de biomassa e produtividade máxima (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância para concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$) e produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$) dos cultivos de *Spirulina platensis* Paracas.

Respostas	Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
$X_{m\acute{a}x}$	Regressão	0,0355	1	0,0355	4,55	4,06
	Resíduos	0,0392	5	0,0078		
	Total	0,0747	6			
$P_{m\acute{a}x}$	Regressão	0,0076	3	0,0025	12,50	5,39
	Resíduos	0,0007	3	0,0002		
	Total	0,0083	6			

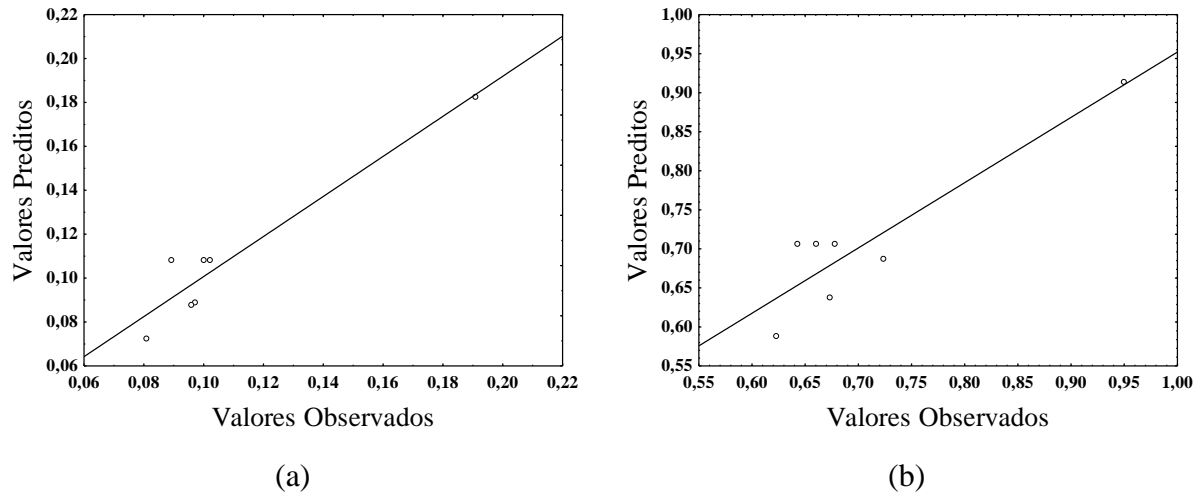
De acordo com a análise de variância, observou-se que os dados experimentais se ajustaram aos modelos, representados pelas variáveis que apresentaram efeito significativo, ($p < 0,10$) (Tabela 4), visto que $F_{calculado}$ foi superior ao $F_{tabelado}$ (Tabela 3). Segundo Bruns, Neto e Scarminio (2010) quando obtém-se F calculado superior ou igual ao F tabelado estatisticamente o modelo é válido.

Tabela 4 - Equações e coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir dos modelos para as respostas concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$) e produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$).

Resposta	Equação	R^2
$X_{m\acute{a}x}$	$0,70 - (0,09.P.N)$	0,8376
$P_{m\acute{a}x}$	$0,11 + (0,03.P) - (0,02.N) - (0,03.P.N)$	0,9000

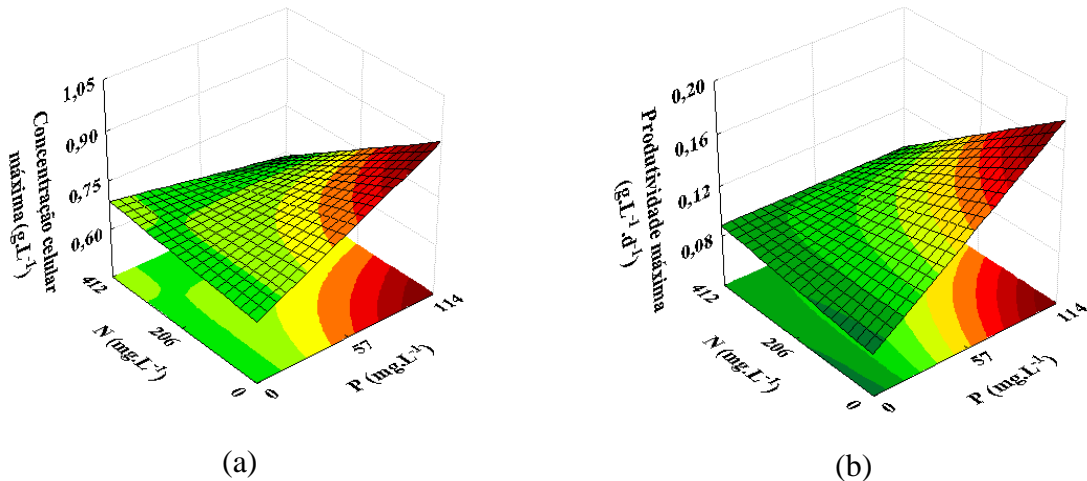
Os modelos para produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$) e concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$) apresentaram boa qualidade de ajuste conforme pode ser observado na Figura 2, a qual apresenta os gráficos de valores observados x valores preditos. Quanto mais os dados se ajustam à reta identidade, melhor é a qualidade do ajuste.

Figura 2 – Valores observados x Valores preditos pelos modelos para produtividade máxima (a) e concentração celular máxima (b) para *Spirulina platensis* Paracas.



Considerando que os modelos foram válidos para as variáveis resposta concentração máxima de biomassa e produtividade máxima, os mesmos foram utilizados para gerar as superfícies de resposta visando estabelecer as melhores condições de concentração de fósforo e nitrogênio (Figura 3).

Figura 3 – Superfícies de resposta para concentração máxima de biomassa (a) e para produtividade máxima (b) da microalga de *Spirulina platensis* Paracas.



Na Figura 3 pode-se observar que quando a microalga *Spirulina platensis* Paracas é cultivada com a maior concentração de fósforo (114 mg.L⁻¹) e sem adição de nitrogênio atinge maiores valores de concentração máxima de biomassa (Figura 3a) e produtividade máxima (Figura 3b). Embora neste cultivo não se tenha adicionado nitrogênio, a quantidade deste nutriente oriunda do inóculo utilizado deve ter sido suficiente para o crescimento da

microalga, pois ocorreu redução de 67% de nitrogênio em relação à concentração inicial contida no meio de cultivo.

Além disso, de acordo com Miller et al.(2002), as cianobactérias quando cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio podem manter seu crescimento através da degradação de suas ficobiliproteínas, obtendo assim nitrogênio para a biossíntese.

O fato de se obter maior produção de biomassa em cultivo com 114 mg.L⁻¹ de fósforo também foi constatado por outros pesquisadores (COSTA et al., 2002; RADMANN; REINEHR; COSTA, 2007) que verificaram que a produção de biomassa por *Spirulina platensis* foi favorecida quando foi utilizada esta concentração de fósforo.

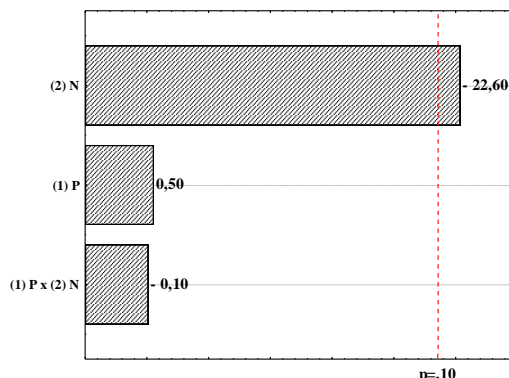
Maiores concentrações de fósforo no meio de cultivo favorece o crescimento de microalgas, pois segundo Lourenço (2006) o fósforo está associado à realização de processos metabólicos celulares, formando muitos componentes estruturais que são necessários para o crescimento de microalgas.

Em relação à análise de tensão superficial dos extratos obtidos a partir das microalgas *Spirulina platensis* Paracas e *Spirulina platensis* LEB 52, as variáveis concentração de fósforo e nitrogênio não tiveram influência significativa ($p > 0,10$) sobre esta resposta, nem mesmo quando foi estudada a interação entre as duas variáveis.

Já para a tensão superficial dos extratos oriundos da *Spirulina* sp. LEB 18 obtidos nos cultivos, apenas a variação da concentração de nitrogênio influenciou de forma significativa ($p < 0,10$), sendo que o aumento da concentração de nitrogênio causou decréscimo da tensão superficial de 22,6 mN.m⁻¹ (Figura 4).

Com isso, a produção de biossurfactantes nestas condições não foi relacionada com condição limitante de nitrogênio, diferenciando de micro-organismos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus* sp. que direcionam seu metabolismo para produção de biossurfactantes após consumo total de nitrogênio (BENINCASA et al., 2002; ESPUNY et al., 1996).

Figura 4 - Diagrama de efeito das variáveis concentração de fósforo e nitrogênio sobre a tensão superficial dos extratos obtidos a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.



Radmann (2011) em estudo realizado com a microalga *Spirulina* sp. LEB-18 verificou a produção extracelular de biossurfactantes quando foi utilizada glicose como fonte de carbono, onde ocorreu redução da tensão superficial no meio de cultivo de 70 mN.m⁻¹ para 43 mN.m⁻¹.

Os biossurfactantes são produzidos extra ou intracelularmente por micro-organismos (MULLIGAN, 2005). Neste estudo, como as extrações de biossurfactantes foram realizadas a partir da biomassa da microalga *Spirulina*, pode-se verificar a produção intracelular destes compostos a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, a qual obteve extratos com tensão superficial de até 31,2 mN.m⁻¹. Esta microalga mostrou-se mais propícia para produção de biossurfactantes em relação às cepas de *Spirulina platensis*, pois segundo Mulligan (2005) um bom surfactante apresenta capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 72,0 para 35,0 mN.m⁻¹.

4 CONCLUSÕES

As variáveis fósforo e nitrogênio apresentaram influência significativa na concentração máxima e produtividade máxima de *Spirulina platensis* Paracas, porém não apresentaram influência significativa destes parâmetros para *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18. A *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou melhores resultados de produção de biomassa quando em comparação com as microalgas *Spirulina platensis* Paracas e *Spirulina* sp. LEB 18.

Em relação à produção de biossurfactantes, *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou maior potencialidade em relação às demais microalgas, pois obteve extrato com tensão superficial de 31,2 mN.m⁻¹, obtido a partir do cultivo realizado com maior concentração de

nitrogênio (412 mg.L^{-1}) e sem adição de fósforo. Com isso, motivando estudos futuros na aplicação de extratos oriundos desta microalga como estabilizante, antimicrobiano, entre outras.

REFERÊNCIAS

- BANAT, I. N.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; FRANCO, J. M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**. v. 2, p. 164-173, 2013.
- BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 868-875, 2006.
- BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M. A.; MORAES, I. O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source, **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, p. 497–503, 2002.
- BINAGHI, L.; BORGHI, A.D.; LODI, A.; CONVERTI, A.; BORGHI, M.D. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1341–1346, 2003.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.
- BRUNS, R. E.; NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S. **Como fazer experimentos**. Porto Alegre. 4.ed. Editora Artmed, 414p., 2010.
- CATALDO, D. A.; HARRON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 59, p. 155-223, 1998.

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 439-442, 2001.

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

ESPUNY, M.J.; EGIDO, S.; RODÓN, I.; MANRESA, A.; MERCANDÉ, M.E. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus sp* 51T7. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 521-526, 1996.

FDA. **Food and Drug Administration** (2002). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: outubro de 2010.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2, 1994.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A. E. DUBINSKY, Z. AARONSON, S. Algal nutrition In RICHMOND, A. (Ed) **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 147-198, 1986.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D. P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoides* grown on dairy industry wastewater. **Bioresource Technology**. v. 144, p. 499-503, 2013.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001.

LOURENÇO S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima. 606p, 2006.

MADKOUR, F. F.; KAMIL, A. E.; NASR, H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 38, p. 51-57, 2012.

MARKOU, G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 533-535, 2012.

MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of α -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. **Food Chemistry**, v. 99, p. 57–63, 2006.

MILLER, S. R.; MARTIN, M.; TOUCHTON, J.; CASTENHOLZ, R. W. Effects of nitrogen availability on pigmentation and carbon assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain sh-94-5. **Archives of Microbiology**, v. 177, p. 392-400, 2002.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NGUYEN, T. T. L.; EDELEN, A.; NEIGHBORS, B.; SABATINI, D. A. Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: Formulation and potential applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 348, p. 498-504, 2010.

RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture**, v. 265, p. 118–126, 2007.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biosurfactantes**. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2011.

RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; HUSSAIN, M. T.; MASOOD, R.; HAQ, A. U.; SADDIQUE, M. T.; JAVID, A.; AHMAD, N. Production of rhamnolipid surfactant and its application in bioscouring of cotton fabric. **Carbohydrate Research**, 2014.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 109-116, 2006.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas - Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 17-21, 2003.

SASSANO, C.E.N.; GIOIELLI, L.A.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 593–598, 2007.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2, São Paulo: Edgard Blücher, 254 p., 2001.

SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment**. 537p. England: John Wiley & Sons Ltda, 2005.

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

SUN, L.; WANG, L.; ZHOU, Y. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1206-1210, 2012.

VON RÜCKERT, G.; GIANI, A. Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 325-331, 2004.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. **Physiology, Cell-biology and Biotechnology**, London: Taylor & Francis, 1997.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 77, p. 9–13, 2002.

ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler.** *Ph.D. Thesis*, University of Paris, 1966.

**ARTIGO II: Formação de nanoemulsões a partir de extratos oriundos da microalga
Spirulina sp. LEB 18 produzida em escala piloto**

**Formação de nanoemulsões a partir de extratos oriundos da microalga *Spirulina* sp.
LEB 18 produzida em escala piloto**

RESUMO

A nanotecnologia é um campo promissor e inovador na área científica, que tem por objetivo manipular a matéria em escala nanométrica. A principal característica é a produção de novos materiais e a atribuição de novas funções aos materiais já conhecidos. Nanoemulsões podem ser definidas como dispersão nanométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo. Este último pode ser obtido por meio de micro-organismos, denominados assim biossurfactantes. A produção de biossurfactantes a partir da microalga *Spirulina* apresenta vantagem, pois este micro-organismo é GRAS (*Generally Recognized as Safe*), não apresentando riscos de toxicidade e patogenicidade. Com isso, este trabalho teve como objetivo desenvolver nanoemulsões a partir de extratos de biossurfactantes oriundos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produzida em escala piloto. Foram testados métodos (esferas de vidro e ultrassonicação) para ruptura celular e avaliados diferentes solventes para a extração de biossurfactantes. Após, foram preparadas emulsões em diferentes velocidades e tempo de agitação, bem como diferentes concentrações da fase oleosa e aquosa. Diante disso, o processo de ruptura celular realizado por ultrassonicação proporcionou a obtenção de extrato com menor tensão superficial ($30,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) e maior índice de emulsificação (69,7%). Foram obtidas nanoemulsões com diâmetro de gotículas de até 532 nm estáveis por pelo menos 30 d, formadas com 0,1% (v/v) de óleo girassol com velocidade de agitação de 24000 rpm durante 30 min. Por fim, os resultados mostraram a potencialidade dos extratos de biossurfactantes de *Spirulina* sp. LEB 18 em formar nanoemulsões, que podem ser aplicadas em diferentes segmentos industriais, tais como farmacêutico, cosmético e alimentos.

Palavras-chave: biossurfactantes, nanoemulsão, tensão superficial.

ABSTRACT

Nanotechnology is a promising and innovative field in science, which aims to manipulate matter at the nanoscale. The main feature is the production of new materials and the assignment of new functions to known materials. Nanoemulsions can be defined as nano-dispersion of oil droplets in an external aqueous phase stabilized by a surfactant system. This last one can be obtained by means of microorganisms, called biosurfactants. The biosurfactants production from *Spirulina* have advantage, because this microorganism is GRAS (Generally Recognized as Safe) with no present risk of toxicity and pathogenicity. Therefore, this study aimed to develop nanoemulsions from extracts of biosurfactants derived from *Spirulina* sp. LEB 18 produced in a pilot scale. Were tested methods (glass beads and ultrasonication) for cell disruption and were evaluated different solvents for extraction of biosurfactants. After, emulsions were prepared using different speeds and stirring time as well as different concentrations of oil phase and water phase. Thus, through the process of cell disruption by ultrasonication performed, it was possible to obtain extract with lower surface tension (30.8 mN.m^{-1}) and highest emulsification index (69.7%). Were obtained nanoemulsion droplets with a diameter until to 532 nm and stable for at least 30 d, formed with 0.1% (v/v) sunflower oil with agitation speed of 24000 rpm for 30 min. Finally, the results showed the potential of biosurfactants extracts from *Spirulina* sp. LEB 18 to form nanoemulsions, which can be applied in different industries such as pharmaceutical, cosmetic and food.

Keywords: biosurfactants, nanoemulsion, surface tension.

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia visa à manipulação de estruturas em nanoescala e integrá-las para formar componentes e sistemas maiores. Os materiais nanoestruturados apresentam suas dimensões em tamanho nanométrico, em escala de um bilionésimo do metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, como tolerância à temperatura e alterações da reatividade química (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Nas últimas décadas, tem crescido o interesse em pesquisas que enfatizam a obtenção de nanoemulsões e métodos para a sua preparação. As nanoemulsões podem ser preparadas mediante a utilização de métodos de baixa ou alta energia de emulsificação. Os métodos de alta energia de emulsificação utilizam dispositivos mecânicos capazes de gerar energia mecânica por meio de alta tensão de cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou método de ultra-som. Os métodos de baixa energia de emulsificação mais utilizadas incluem o método de temperatura de inversão de fases, o ponto de inversão da emulsão e o método de emulsificação espontânea (KOROLEVA; YURTOV, 2012).

As nanoemulsões são compostas por pelo menos uma fase oleosa, uma fase aquosa e um surfactante (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003). Surfactantes são compostos que possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, estes se adsorvem na interface entre a fase aquosa e oleosa impedindo a separação de fases (DALVIN, 2011).

Quase todos os surfactantes utilizados são quimicamente derivados do petróleo, porém o interesse pelos biossurfactantes, surfactantes produzidos por micro-organismos, tem aumentado devido à tendência de substituição de aditivos sintéticos pelos naturais, visto apresentarem menor toxicidade e maior biodegradabilidade (CHANDANKERE et al., 2014; NITSCHKE; PASTORE, 2002; RUFINO et al., 2013).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química da molécula e com o micro-organismo produtor, compreendendo uma ampla variedade de estruturas químicas como glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, lipídios neutros, ácidos graxos e fosfolipídios (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). A microalga *Spirulina* apresenta potencial para produção biossurfactantes, pois apresenta em sua composição compostos como glicolipídios, lipídios neutros e fosfolipídios (MENDES; REIS; PALAVRA, 2006).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo desenvolver nanoemulsões a partir de extratos de biossurfactantes oriundos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 produzida em escala piloto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) foi cultivada de modo semicontínuo em planta piloto localizada as margens da Lagoa Mangueira (33°30'13'' S e 53°08'59'' W) em Santa Vitória do Palmar - RS, Brasil.

O cultivo foi realizado em biorreator do tipo *raceway* de 10.000 L com agitação contínua realizada por pás rotativas a 18 rpm e protegido por túnel de filme transparente com proteção contra raios UV em condições ambientais não controladas. Como meio de cultura foi utilizado água da Lagoa Mangueira suplementada com 20% (v/v) de meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), sendo o volume do meio mantido, devido à evaporação, com a adição de água da Lagoa Mangueira. A cada 72 h foi realizada a separação por filtração de 25% da biomassa produzida (MORAIS et al., 2009).

A biomassa foi colhida entre os dias 14 e 29 de fevereiro de 2012 e seca em estufa com circulação de ar por 5 h a 50°C. Após, foi congelada, moída (moinho de bolas) e peneirada para obtenção partículas com diâmetro de 53 µm.

2.2 Rompimento celular e extração dos biossurfactantes da microalga

Diferentes métodos foram avaliados para verificar a eficiência do rompimento da parede celular da microalga, ambos utilizando metanol como solvente. O primeiro foi realizado conforme metodologia descrita por Radmann (2011), em agitador de tubos (10 min) com solvente e esferas de vidro, seguido de banho ultrassônico (20 min), sendo estes procedimentos repetidos 3 vezes.

No segundo método de rompimento celular as amostras foram ressuspensas em 3 mL de metanol e submetidas a sonda ultrassônica durante 5 min (125 W e 20 kHz) (Q125, QSonica), sendo mantidas em banho de gelo para evitar evaporação do metanol. Após as

amostras foram agitadas em agitador rotatório (3525, Lab-Line) a 160 rpm durante 5 h com 50 mL de metanol, sendo em seguida centrifugadas (5760 g por 10 min) (5430, Eppendorf).

A evaporação do metanol foi realizada em rota-evaporador (Rotovapor-R, Buchi) a 60 °C. Após remoção do metanol fez-se ressuspensão em água utilizando-se a proporção de 0,1 g de biomassa seca para 7,5 mL de água. O extrato foi obtido após centrifugação (5760 g por 10 min) (5430, Eppendorf), sendo este oriundo da fração sobrenadante. As etapas posteriores a agitação em agitador rotatório foram realizadas conforme descrito por Radmann (2011).

Após a definição do método para ruptura celular da microalga, foram realizadas extrações dos biossurfactantes utilizando etanol, etanol-hexano e metanol-hexano, seguindo os mesmos procedimentos relatados anteriormente. Porém quando foi utilizado hexano, após a etapa de agitação em agitador rotatório, foi adicionado 50 mL de hexano juntamente com 50 mL de etanol ou metanol. Logo agitou-se a mistura e foi realizada separação dos solventes em funil de separação, onde a fração superior contendo hexano foi descartada, sendo este procedimento realizado mais 2 vezes. A fração composta por metanol ou etanol foi utilizada de acordo com os procedimentos relatados anteriormente.

Os extratos obtidos, assim como um surfactante comercial Tween 20 (Sigma Aldrich), foram avaliados quanto à redução da tensão superficial em relação à água e quanto ao índice de emulsificação.

2.3 Determinação da tensão superficial

A medida da tensão superficial dos extratos foi realizada em tensiômetro (K100, Kruss) utilizando a metodologia Wilhelmy. Este método consiste na interação entre uma placa, normalmente de platina, com a superfície do fluido a ser testado. A força que o fluido exerce para se desprender da placa e voltar à posição inicial, está diretamente relacionada com a tensão superficial (ADAMSON; GAST, 1997). As análises foram realizadas a 20°C e os resultados correspondem à média de 3 leituras com os respectivos desvios padrão.

2.4 Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação dos extratos obtidos foi determinado utilizando-se óleo mineral parafínico (Fisher Scientific), por se tratar de testes preliminares, e método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Para tanto, foi empregado 1,2 mL de óleo (60% v/v) (Sigma

Aldrich) o qual foi injetado em 0,8 mL de extrato microalgal (40% v/v) contido em tubo de ensaio. Em seguida, os líquidos foram homogêneos em agitador de tubos (Vortex-Genie 2T, Scientific Industries) na velocidade máxima durante 2 min e deixados em repouso por 24 h. O índice de emulsificação (percentual de emulsificação) foi calculado após 24 h de preparo das emulsões, tendo por base o valor da altura da camada emulsificada (cm) dividido pela altura total da coluna do líquido (cm). As análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Preparo das emulsões e nanoemulsões

Para o preparo das emulsões e nanoemulsões utilizou-se homogêneo de alta velocidade (Ultra Turrax T25, IKA). Como fase aquosa foi utilizado extrato da microalga contendo biossurfactantes e como fase oleosa, óleo girassol (Sigma Aldrich). Foram utilizadas 2 formulações para o preparo das emulsões, uma contendo 10% da fase oleosa e 90% de fase aquosa (v/v) e a outra 0,1% da fase oleosa e 99,9% de fase aquosa (v/v).

A primeira formulação foi definida com base na concentração de óleo que é utilizada em emulsões para bebidas, como suco de frutas e refrigerantes, que pode chegar até 20% (ALMEIDA, 2012; MIRHOSSEIN, et al., 2007) e a segunda formulação foi definida com base no rendimento do extrato de biossurfactantes obtido da microalga, sendo de 0,1% (m/v). Com isso foi utilizada a mesma proporção de fase aquosa (extrato de biossurfactantes) e fase oleosa.

As emulsões foram preparadas injetando-se a fase oleosa sobre a fase aquosa e agitando-se durante 5 min a 13500 rpm. Posteriormente foi verificado o tamanho da gotícula das emulsões após 1 e 15 d, sendo estas mantidas em temperatura ambiente.

Foram também elaboradas nanoemulsões utilizando-se maior velocidade e diferentes tempos de agitação, contendo 0,1% de fase oleosa e 99,9% de fase aquosa (v/v). As nanoemulsões foram preparadas agitando-se durante 5, 15 e 30 min a 24000 rpm. Para avaliar a estabilidade das nanoemulsões, mantidas em temperatura ambiente, foram analisados tamanho da gotícula e pH após 1, 15 e 30 d e potencial zeta após 30 d.

2.6 Análise do tamanho de gotículas das emulsões e nanoemulsões

O diâmetro médio das gotículas presentes nas emulsões e nanoemulsões foram determinados pela técnica de difração a laser utilizando um analisador de tamanho de partícula Coulter LS 230 (Beckman). Esta técnica baseia-se no que ao fazer incidir um feixe

de energia luminosa sobre uma gota a quantidade total de energia luminosa difratada é proporcional à área projetada. O diâmetro equivalente corresponde ao de uma esfera com área igual à projetada, o que permite aferir o tamanho da gota (ALLEN, 2003). Para realização da medida do tamanho de gotas, foram utilizados 2 mL da emulsão, os quais foram colocados diretamente no equipamento, sendo esta análise realizada em triplicata.

2.7 Determinação do valor de pH das nanoemulsões

A medida de pH foi determinada por meio da leitura direta das nanoemulsões em pHmetro digital, sendo os resultados referentes a média de 3 leituras com os respectivos desvios padrão.

2.8 Determinação do potencial zeta das nanoemulsões

O potencial zeta foi determinado pela mensuração da mobilidade eletroforética das gotas. A técnica consiste na aplicação de um campo elétrico que induz a migração de partículas carregadas em solução para um eletrodo de carga contrária, com velocidade que é correlacionada com o valor de potencial zeta (DELGADO et al., 2007). Para a determinação do potencial zeta (Zetasizer Nano ZSP, Malvern), 0,1 mL da amostra foi diluída em 3 mL de água destilada, homogeneizada e submetida à análise. Os resultados correspondem à média de 3 leituras com os respectivos desvios padrão.

2.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através de análise de variância e teste Tukey, com nível de 5% de significância (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados referentes à ruptura celular da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 pode-se verificar que as amostras submetidas à ultrassonicação, apresentaram menores valores de tensão superficial quando em comparação com o uso de esferas de vidro. Em relação ao índice de emulsificação, não houve diferença significativa entre os dois métodos (Tabela 1).

O fato do valor de tensão superficial ter sido inferior nos extratos obtidos a partir do método de ultrassonicação pode estar associado a este ter sido mais eficiente na ruptura da parede celular da microalga. De acordo com Silva (2013), a ultrassonicação causa colisão das bolhas em uma solução, embora as bolhas sejam bem menores que as células das microalgas, sua colisão cria pequenas regiões de pressões extremamente altas que podem romper a parede celular desses micro-organismos. Com isso, causando a liberação dos biossurfactantes presentes intracelularmente, pois segundo Desai e Banat (1997) estes compostos produzidos pelos micro-organismos são secretados extracelularmente ou encontram-se ligados à célula.

Tabela 1 - Tensão superficial (TS) e Índice de emulsificação (I) após 1 d de extratos obtidos através da utilização de esferas de vidro ou ultrassonizadas.

Tipo de extração	TS (mN.m ⁻¹)	I (%)
Esferas de vidro	31,3±0,09 ^a	67,1 ± 0,9 ^a
Ultrassonicação	30,8±0,12 ^b	69,7 ± 1,6 ^a

*Resultados com letras iguais na mesma coluna não diferiram entre si, enquanto com letras diferentes apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Como o método de ultrassonicação foi mais eficiente na ruptura celular da microalga, este foi selecionado para ser utilizado nas próximas extrações realizadas ao longo deste estudo.

Prabakaran e Ravindran (2011) em estudo realizado com a microalga *Chlorella* sp. também verificaram que a ultrassonicação foi mais eficiente para ruptura celular frente a outros métodos, como autoclavagem, uso de esferas de vidro e micro-ondas. Além disso, apontaram este método como mais aplicável em larga escala.

Em relação às extrações realizadas com diferentes solventes, foram obtidos extratos que apresentaram tensão superficial entre 30,8 mN.m⁻¹ e 34,5 mN.m⁻¹ (Tabela 2), indicando a presença de compostos de superfície ativa. Segundo Mulligan (2005) um eficiente surfactante pode diminuir a tensão superficial da água de 72,0 para 35,0 mN.m⁻¹.

Tabela 2 - Tensão superficial (TS) e Índice de Emulsificação após 1 d (I) de extratos obtidos utilizando-se diferentes solventes.

Solvente utilizado na extração	TS (mN.m ⁻¹)	I (%)
Metanol	30,8±0,12 ^a	69,7±1,63 ^a
Metanol e hexano	32,1±0,19 ^b	66,0 ± 1,53 ^{ab}
Etanol	32,2± 0,09 ^b	66,4 ± 1,38 ^{ab}
Etanol e hexano	34,5±0,26 ^c	64,8 ± 1,60 ^b

*Resultados com letras iguais na mesma coluna não diferiram entre si, enquanto com letras diferentes apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste de Tukey.

Quando foi utilizado somente metanol na extração dos biossurfactantes, obteve-se menor tensão superficial (30,8 mN.m⁻¹), sendo este resultado inferior ao obtido quando foram utilizados outros solventes (Tabela 2) e ao padrão comercial utilizado, Tween 20, o qual apresentou tensão superficial de 36,6 mN.m⁻¹.

A extração realizada com hexano permite a extração de lipídios neutros, pois estão ligados covalentemente e podem ser extraídos por solventes apolares. Enquanto, lipídios polares, os quais estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los, como é o caso do metanol e etanol (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

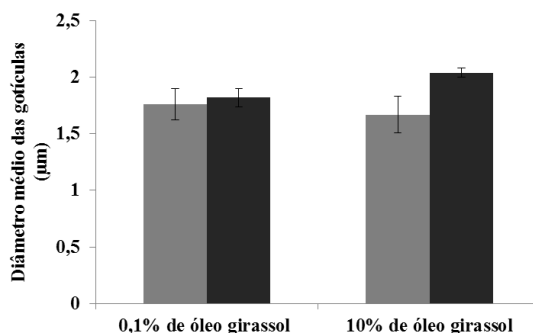
Nas extrações que não foram realizadas lavagem com hexano obteve-se menor tensão superficial, indicando que compostos de superfície ativa foram extraídos com o hexano. Com isso e também pelo fato do etanol ser um solvente biodegradável e menos tóxico em relação ao metanol, optou-se por utilizar o extrato obtido quando foi utilizado etanol na extração para a formulação de emulsões.

Como solventes polares extraem compostos polares, provavelmente este extrato continha compostos mais polares, como fosfolipídios, glicolipídios e lipoproteínas (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012; MANIRAKIZA; COVACI; SCHEPENS, 2001).

Quanto ao índice de emulsificação, o tensoativo comercial (Tween 20) apresentou maior valor (78,6%) em relação aos extratos obtidos. Porém, como foram adicionados 60% (v/v) de óleo nas formulações para verificar o índice de emulsificação, constatou-se que todo o óleo foi emulsionado, uma vez que os índices de emulsificação foram superiores a 60% (Tabela 2).

Em relação às emulsões formadas com velocidade de agitação de 13500 rpm durante 5 min, a Figura 1 apresenta o diâmetro médio das gotículas presentes na emulsões preparadas com 0,1% e 10% de óleo girassol após 1 d e 15d.

Figura 1 - Diâmetro das gotículas presentes nas emulsões elaboradas com 0,1% e 10% de óleo girassol após (☰) 1 e (☷) 15 d.



De acordo com a Figura 1, pode-se observar que a emulsão elaborada com 0,1% de óleo girassol apresentou menor variação no tamanho da gotícula da emulsão entre 1 d e 15 d em relação à emulsão com 10% de óleo. Além disso, de acordo com a análise visual, após 15 d de preparo, a emulsão formada com 10% de óleo (Figura 2a) apresentou cremação e separação de fases, já a emulsão com 0,1% de óleo apresentou pequena separação da fase oleosa (Figura 2b).

Figura 2 - Emulsões preparadas com 10% de óleo girassol (a) e 0,1% de óleo girassol (b).



Esta instabilidade na emulsão formada com 10% de óleo de girassol pode estar relacionada com a diferença de densidades entre as gotículas presentes na emulsão, formando assim cremação. Neste processo, de acordo com Robins (2000), as gotículas menos densas tendem a ir ao topo.

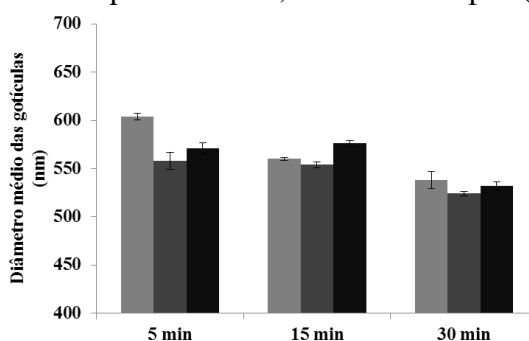
A diferença de densidade entre as gotículas pode ser minimizada pela diminuição do tamanho de gotículas mais densas, a qual pode ser alcançada com o aumento do tempo e velocidade de agitação na formação da emulsão (MEZADRI, 2010; SCHAFFAZICK, 2006).

Outro fator que pode causar a instabilidade da emulsão é a concentração insuficiente de surfactante para estabilizar as gotículas de óleo formadas, ocasionando o aumento do tamanho de gotas (CHANG et al, 2006).

Com a redução da concentração de óleo para 0,1% (v/v) na formação da emulsão, a concentração de biossurfactante deve ter sido suficiente para estabilizar as gotículas, não ocorrendo a formação de cremação e diminuindo a quantidade de óleo na superfície da emulsão. Porém como esta apresentou pequena separação de óleo, para a formulação de novas emulsões, manteve-se a concentração de óleo em 0,1% (v/v) e aumentou-se a velocidade de agitação para 24000 rpm durante 5, 15 e 30 min.

De acordo com a Figura 3, pode-se verificar que a nanoemulsão obtida com 30 min de agitação apresentou menor variação de tamanho de gotícula no período entre 1 e 30 d. Este fato pode ser justificado devido ao maior tempo de agitação durante o preparo da nanoemulsão, pois de acordo com Araújo (2004) maior tempo de agitação no preparo da nanoemulsão ocasiona gotículas de menor tamanho, aumentando assim a estabilidade.

Figura 3 - Diâmetro das gotículas presentes nas nanoemulsões preparadas com 0,1% de óleo de girassol e agitação de 24000 rpm durante 5, 15 e 30 min após (☉) 1, (☽) 15 e (☾) 30 d.



O potencial zeta é um importante parâmetro para a avaliação da estabilidade físico-química das nanoemulsões. Se o potencial zeta for relativamente elevado em módulo (maior de 30 mV) as forças repulsivas do sistema superam as forças de atração (ROLAND et al., 2003). Partículas com potencial zeta maior que 30 mV em módulo são requeridas para uma excelente estabilização eletrostática, pois a diminuição desse potencial facilita a agregação das partículas (MARCATO, 2009).

O valor de pH é outro parâmetro de monitoramento da estabilidade em nanoemulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas ou

crescimento bacteriano (TADROS et al., 2004). Conforme os resultados apresentados na Tabela 3 observam-se que todas as nanoemulsões demonstraram estabilidade durante o período avaliado de 30 d, uma vez que os valores de pH não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) e os valores de potencial zeta, em módulo foram superiores a 30 mV.

Tabela 3 - Parâmetros de estabilidade das diferentes nanoemulsões preparadas com 0,1% de óleo de girassol e agitação de 24000 rpm durante 5, 15 e 30 min.

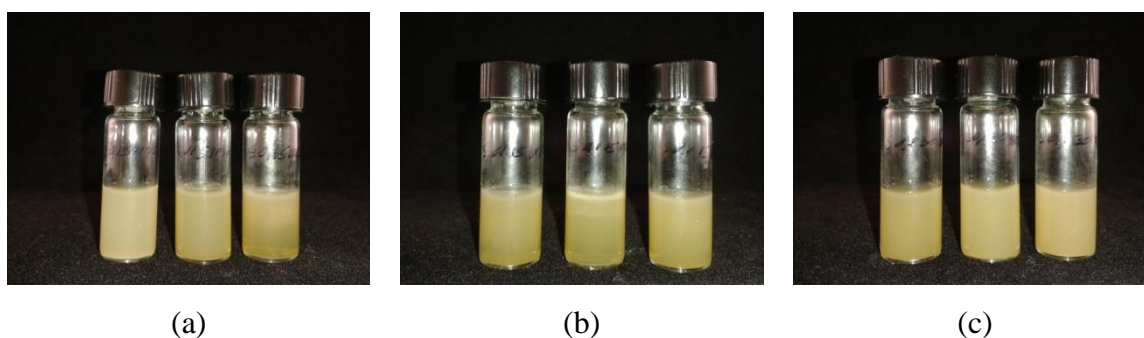
Tempo de preparo (min)	pH			D (nm)	Potencial Zeta (mV)
	1 d	15 d	30 d	30 d	30 d
5	7,4±0,4 ^a	7,5±0,5 ^a	7,2±0,2 ^a	571±5,7 ^a	-37,3±0,5
15	7,7±0,2 ^a	6,9±0,6 ^a	7,1±0,3 ^a	576±3,1 ^a	-40,0±0,4
30	7,4±0,2 ^a	6,8±0,3 ^a	7,2±0,2 ^a	532±4,0 ^b	-39,8±0,9

*Resultados com letras iguais na mesma linha (pH) e mesma coluna (D) não diferiram entre si, enquanto com letras diferentes apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste de Tukey.

De acordo com a Tabela 3, pode-se verificar a obtenção de nanoemulsões com diâmetro de gotículas de até 532 nm após período de 30 d, formada com agitação durante 30 min, sendo este tamanho inferior as nanoemulsões formadas durante 5 e 15 min. Provavelmente este menor tamanho de gotas foi decorrente do maior tempo de agitação da primeira em relação às demais nanoemulsões. De acordo com Mezdri (2010) e Schaffazick (2006) conforme aumenta-se o tempo de agitação têm-se gotículas de menor tamanho, devido à maior energia empregada no sistema.

A Figura 4 apresenta as nanoemulsões que foram elaboradas com 0,1% de óleo de girassol após 30 d de preparo.

Figura 4 - Nanoemulsões preparadas com 0,1% de óleo de girassol e agitação de 24000 rpm durante 5 (a), 15 (b) e 30 min (c).



De acordo com a análise visual (Figura 4), pode-se observar que as nanoemulsões não demonstraram formação de cremeação e separação de fases. Porém, a nanoemulsão que apresentou menor tamanho de diâmetro de gotícula (Figura 4c), mostrou maior estabilidade frente às demais (Figuras 4a e 4b) devido a maior uniformidade.

4 CONCLUSÕES

O método de ultrassonicação mostrou-se ser mais eficiente na ruptura celular da microalga, devido a obtenção de extrato com menor tensão superficial ($30,8 \text{ mN.m}^{-1}$) quando comparado ao uso de esfera de vidro. Em relação aos solventes utilizados, optou-se por utilizar na formulação das nanoemulsões, extratos obtidos quando foi utilizado etanol na extração de biossurfactantes. A partir dos extratos obtidos foram verificados índices de emulsificação acima de 64%, indicando que todo óleo foi emulsionado.

O aumento da velocidade e do tempo de agitação tiveram influência no tamanho de gotículas das nanoemulsões formadas com 0,1% (v/v) de óleo girassol. Quando foi utilizada maior velocidade (24000 rpm) e maior tempo de agitação (30 min) obteve-se nanoemulsão com menor diâmetro de gotículas (532 nm), apresentando-se estável por pelo menos 30 d.

As nanoemulsões obtidas apresentam potencialidades de aplicações na indústria alimentícia, como por exemplo, no aumento de estabilidade de compostos, os quais podem ser utilizados no controle do aroma, cor, textura ou conservação dos alimentos. Além disso, podem ser aplicadas nas áreas farmacêutica e cosmética.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, A. W., GAST, A. P., **Physical Chemistry of Surfaces**, 6 ed., New York John Wiley & Sons, Inc., 1997.

ALMEIDA, T. C. A. **Avaliação da Estabilidade de Emulsões Concentradas em Bebidas**. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

ARAÚJO, M. M. S. **Estudo de quebra de emulsões de petróleo utilizando microemulsões e célula de desidratação eletrostática**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

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

- BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.
- CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CAI, M.; MASAKORALA, K.; JAIN, A. K.; CHOI, M. M. F. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. **Fuel**, v. 122, p. 140-148, 2014.
- CHANG, C. B.; GRAVES, S. M.; MASON, T. G.; MELESON, K.; WILKING, J. N. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. 636-664, 2006.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 327p., 2011.
- DESAI, J. D.; BANAT, M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, p. 1860-1870, 2009.
- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.
- KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, p. 21- 43, 2012.
- MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.
- MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6 (2), p. 01-37, 2009.
- MEZADRI, H. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos**. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ouro Preto, Brasil, 2010.
- MIRHOSSEIN, H.; PING TAN, C.; HAMIDB, N.; YUSOF, S. Modeling the Relationship between the main emulsion components and stability, viscosity, fluid behavior, zeta potential, and electrophoretic mobility of orange beverage emulsion using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7659-7666, 2007.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M., ANDRADE, M. R., TEIXEIRA, G. G., BRUSHCH, L. R. F., COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p.60-64, 2009.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Campinas: Editora Unicamp. 299 p., 1995.

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

PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**. v. 53, p. 150-154, 2011.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2011.

ROBINS, M. M. Emulsions - creaming phenomena. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 265-272, 2000.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil in water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v, 28, p. 1-5, 2013.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Span 20/Tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 218, p. 241-254, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina**. 276f. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Porto Alegre, Brasil, 2006.

SILVA, A. P. F. S. **Eletroflotação não convencional aplicada à separação e ruptura celular de microalgas: Um avanço na viabilidade de geração de biodiesel**. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2013.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une Cyanophyce, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler**. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ARTIGO III: Capacidade emulsificante de extratos obtidos a partir das microalgas
Spirulina sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52

Capacidade emulsificante de extratos obtidos a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52

RESUMO

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido a sua importância nutricional, econômica e ecológica. A microalga do gênero *Spirulina* pode ser utilizada em indústrias de alimentos e farmacêutica, pois não apresenta riscos de toxicidade e patogenicidade. Esta microalga é produtora de compostos como glicolípidios e fosfolípidios, que são classificados como biossurfactantes, os quais podem ser utilizados na formação de emulsões. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52, bem como a capacidade emulsificante de extratos oriundos das microalgas. Para isso foram realizados experimentos utilizando Delineamento Fatorial Completo 2^2 com triplicata no ponto central visando avaliar a influência da concentração de fósforo e nitrogênio, presentes no meio de cultivo, na obtenção de extratos microalgais por meio de medidas de tensão superficial, índice de emulsificação e diâmetro médio de gotas das emulsões preparadas a partir dos extratos. Os extratos obtidos a partir das microalgas apresentaram tensão superficial abaixo de $36,3 \text{ mN.m}^{-1}$, indicando a produção de biossurfactantes. Em relação ao índice de emulsificação foram atingidos valores superiores a 59%, porém as concentrações utilizadas de nitrogênio e fósforo não apresentaram influência significativa nesta resposta para ambas microalgas. A partir dos extratos de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52, foi possível obter nanoemulsões estáveis por até 30 d, com diâmetro médio de gotículas variando entre 554 e 615 nm. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, tanto os extratos microalgais como as nanoemulsões obtidas apresentam potencialidade de aplicação em diversos processos industriais, como nas áreas ambiental, farmacêutica, cosmético e alimentos.

Palavras-chave: biossurfactantes, índice de emulsificação, tensão superficial.

ABSTRACT

Microalgae have been studied in biotechnology research due to its nutritional, economic and ecological importance. The microalgae of the genus *Spirulina* can be used in food and pharmaceutical industries because not present risk of toxicity and pathogenicity. This microalga is producing compounds such as glycolipids and phospholipids, which are classified as biosurfactants, which can be used in forming emulsions. This study aimed to evaluate the production of biosurfactants by the microalgae *Spirulina* sp. LEB 18 and *Spirulina platensis* LEB 52, as well as the emulsifying capacity of extracts derived from microalgae. For this, the experiments were performed using Full Factorial Design 2^2 to evaluate the influence of the concentration of monobasic potassium phosphate and sodium nitrate, present in the culture medium, in the obtaining microalgal extracts by measure of surface tension, emulsifying index and average droplet diameter of emulsions prepared from the extracts. The extracts obtained from microalgae showed surface tension below 36.3 mN.m^{-1} , indicating the production of biosurfactants. Regarding the emulsification index, were reached values higher than 59%, but the concentrations of nitrogen and phosphorus used showed no significant influence on this response for both microalgae. From the extracts of *Spirulina* sp. LEB 18 and *Spirulina platensis* LEB 52, it was possible to obtain stable nanoemulsions for up to 30 d, with an average diameter of droplets between 554 and 615 nm. According to the results obtained in this study, microalgal extracts and nanoemulsions obtained have potential application in various industrial processes such as in the environmental, pharmaceutical, cosmetic and food areas.

Keywords: biosurfactants, emulsification index, surface tension.

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais, sendo grande maioria sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com legislações de controle do meio ambiente levam à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (CHANDANKERE et al., 2014; NITSCHKE; PASTORE, 2002; RUFINO et al., 2013).

Biossurfactantes são surfactantes produzidos por micro-organismos que apresentam uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar). A porção apolar geralmente consiste de cadeias hidrocarbônicas com um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados. Já a porção polar pode ser um éster, hidróxido, fosfato, grupos carboxílicos, carboidratos, aminoácidos ou peptídios (BOGNOLO, 1999; DESAI; BANAT, 1997).

Devido a sua diversidade estrutural (glicolipídios, lipopeptídeos, ácidos graxos, entre outros), baixa toxicidade e biodegradabilidade, os biossurfactantes podem ser amplamente utilizados em processos de produção de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

A microalga *Spirulina*, por ser GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (FDA, 2002), apresenta vantagem para produção de biossurfactantes, uma vez que não apresenta riscos de toxicidade e patogenicidade. Além disso, a estimulação da microalga para a produção de biossurfactantes pode ser influenciada com uso de diferentes fontes de nutrientes no meio de cultura, ou também pelas condições de cultivo como pH, temperatura e agitação (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Segundo Batista et al. (2006), as propriedades de superfície ativa mais importantes avaliadas na procura por micro-organismos produtores de biossurfactantes com potencial para aplicação industrial são a redução da tensão superficial, a formação de emulsão e capacidade de estabilização.

Emulsões são sistemas coloidais de no mínimo dois líquidos imiscíveis, normalmente uma fase aquosa e uma fase oleosa, um disperso no outro. Estes sistemas possuem estabilidade baixa, a qual pode ser acentuada com a presença de surfactantes (VELIKONJA; KOSARIC, 1993).

Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52, bem como a capacidade emulsificante de extratos oriundos destas microalgas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Neste estudo foi utilizada a microalga *Spirulina platensis* LEB 52 (COSTA et al., 2001), a qual apresentou maior crescimento no artigo 1 e a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), a qual obteve extratos com menor tensão superficial no artigo 1, ambas microalgas são pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foram cultivadas em fotobiorreatores tubular (2 L) em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

Os cultivos foram realizados de acordo com Delineamento Fatorial Completo 2² com triplicata no ponto central (Tabela 1), sendo o nível inferior representado pelo meio de cultivo que não teve adição de fósforo e nitrogênio, o nível central por 50% da concentração de fósforo e nitrogênio contidos no meio Zarrouk e o nível superior representado por 100% da concentração de fósforo e nitrogênio contidos no meio Zarrouk.

Tabela 1 - Níveis reais e codificados das variáveis fósforo (P) e nitrogênio (N) para os cultivos das microalgas.

Variável (mg.L ⁻¹)	Níveis codificados		
	-1	0	+1
P	0	57	114
N	0	206	412

A partir do delineamento experimental foram avaliadas a influência da concentração dos componentes fósforo e nitrogênio, presentes no meio de cultivo, nos extratos microalgais, por meio da medida da tensão superficial, índice de emulsificação e diâmetro médio das gotas das emulsões formuladas com os extratos após 15 d de preparo.

Os ensaios foram realizados a 30°C, com iluminância de 41,6 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (fotoperíodo 12 h claro/escuro) e com agitação contínua por meio de injeção de ar estéril a 0,07 vvm por bombas de diafragma. A concentração de biomassa inicial dos cultivos foi 0,2

g.L^{-1} . Ao final dos cultivos, entre 13 e 16 d, a biomassa microalgal foi separada por centrifugação (9205 g por 10 min) (CR 22GIII, Hitachi), congeladas durante 24 h a -70°C e liofilizadas durante 48 h.

2.2 Extração de biossurfactantes das microalgas

Para a extração de biossurfactantes a biomassa foi ressuspensa em 3 mL de etanol e submetida ao rompimento da parede celular em sonda ultrassônica durante 5 min (125 W e 20 kHz) (Q125, QSonica), sendo mantida em banho de gelo para evitar evaporação do etanol. Após as amostras foram agitadas em agitador rotatório (3525, Lab-Line) a 160 rpm durante 5 h com 50 mL de etanol, sendo em seguida centrifugada (5760 g por 10 min) (5430, Eppendorf).

A evaporação do etanol foi realizada em rota- evaporador (Rotovapor-R, Buchi) a 60°C . Após remoção do etanol fez-se ressuspensão em água utilizando-se a proporção de 0,1 g de biomassa seca para 7,5 mL de água. O extrato foi obtido após centrifugação (5760 g por 10 min) (5430, Eppendorf), sendo este oriundo da fração sobrenadante. As etapas após a ruptura celular foram realizadas conforme a metodologia descrita por Radmann (2011).

2.3 Determinação da tensão superficial

A medida da tensão superficial dos extratos foi realizada em tensiômetro (K100, Kruss) utilizando a metodologia Wilhelmy. Este método consiste na interação entre uma placa, normalmente de platina, com a superfície do fluido a ser testado. A força que o fluido exerce para se desprender da placa e voltar à posição inicial, está diretamente relacionada com a tensão superficial (ADAMSON; GAST, 1997). A medida inicial da tensão superficial foi realizada utilizando-se água destilada, a qual apresenta valor de $72,0 \text{ mN.m}^{-1}$ (MULLIGAN, 2005). As análises foram realizadas a 20°C e os resultados correspondem à média de 3 leituras.

2.4 Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação dos extratos foi determinado utilizando método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Para tanto, foi empregado 1,2 mL de óleo girassol (60% v/v) (Sigma Aldrich) o qual foi injetado em 0,8 mL de extrato microalgal (40% v/v) contido

em tubo de ensaio. Em seguida, os líquidos foram homogeneizados em agitador de tubos (Vortex-Genie 2T, Scientific Industries) na velocidade máxima durante 2 min e deixados em repouso por 24 h. O índice de emulsificação (percentual de emulsificação) foi calculado após 24 h de preparo das emulsões, tendo por base o valor da altura da camada emulsificada (cm) dividido pela altura total da coluna do líquido (cm). As análises foram realizadas em triplicata.

2.5 Preparo das emulsões e nanoemulsões

Para o preparo das emulsões e nanoemulsões utilizou-se homogeneizador de alta velocidade (Ultra Turrax T25, IKA). Como fase aquosa foi utilizado extrato obtido na extração de biossurfactantes e como fase oleosa, óleo girassol. Para preparo da emulsão foram utilizados 10% da fase oleosa e 90% de fase aquosa (v/v). Essa formulação foi definida com base na concentração de óleo que é utilizada em emulsões para bebidas, como suco de frutas e refrigerantes, que pode chegar até 20% (ALMEIDA, 2012; MIRHOSSEIN, et al., 2007). A emulsão foi preparada injetando-se a fase oleosa sobre a fase aquosa e agitando-se durante 5 min a 13500 rpm. Posteriormente, foi avaliado o tamanho da gotícula das emulsões após 15 d, sendo estas mantidas em temperatura ambiente.

A partir do delineamento experimental realizado, foram selecionadas as emulsões que apresentaram menor tamanho de gotícula e preparadas nanoemulsões com 0,1% de fase oleosa e 99,9% de fase aquosa (v/v). Essa nova formulação foi definida com base no rendimento do extrato de biossurfactantes obtido através das microalgas, sendo de 0,1% (m/v), com isso foi utilizada a mesma proporção de extrato de biossurfactantes (fase aquosa) e fase oleosa. Para formar as nanoemulsões agitou-se durante 30 min a 24000 rpm. Visando avaliar a estabilidade das nanoemulsões, mantidas em temperatura ambiente, foram analisados tamanho da gotícula e pH após 1, 15 e 30 d e potencial zeta após 30 d.

2.6 Análise do tamanho de gotículas das emulsões e nanoemulsões

O diâmetro médio das gotículas presentes nas emulsões e nanoemulsões foram determinados pela técnica de difração a laser utilizando um analisador de tamanho de partícula Coulter LS 230 (Beckman). Esta técnica baseia-se na incidência um feixe de energia luminosa sobre uma gota. A quantidade total de energia luminosa difratada é proporcional à área projetada. O diâmetro equivalente corresponde ao de uma esfera com área igual à

projetada, o que permite aferir o tamanho da gota (ALLEN, 2003). Para realização da medida foi utilizada alíquota de 2 mL da emulsão, a qual foi colocada diretamente no equipamento. Os resultados correspondem à média de 3 leituras.

2.7 Determinação do valor de pH das nanoemulsões

A medida de pH foi realizada por meio da leitura direta das nanoemulsões em pHmetro digital, sendo os resultados referentes a média de 3 leituras com os respectivos desvios padrão.

2.8 Determinação do potencial zeta das nanoemulsões

O potencial zeta foi determinado pela mensuração da mobilidade eletroforética através do fenômeno eletrocinético, o qual consiste na aplicação de um campo elétrico que induz a migração de partículas carregadas em solução para um eletrodo de carga contrária, com velocidade que é correlacionada com o valor de potencial zeta (DELGADO et al., 2007). Para a determinação do potencial zeta (Zetasizer Nano ZSP, Malvern), 0,1 mL da amostra foi diluída em 3 mL de água destilada, homogeneizada e submetida à análise. Os resultados correspondem à média de 3 leituras.

2.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através de análise de variância e teste Tukey, com nível de 5% de significância (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 2, pode-se verificar que quando *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada sem adição de nitrogênio e de fósforo o extrato obtido apresentou menor tensão superficial ($26,7 \text{ mN.m}^{-1}$), provavelmente devido à condição limitante de nutrientes. Benincasa et al. (2002), Desai e Banat (1997) verificaram produção de biossurfactantes quando a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento, devido à limitação de nitrogênio.

O fósforo também é um nutriente importante, pois desenvolve importante função na maioria dos processos celulares, como na transferência de energia e na constituição de

moléculas estruturais (KAPLAN et al., 1990; LOURENÇO, 2006). Mulligan, Mahmoudides e Gibbs (1989) verificaram aumento na produção de biossurfactantes quando a fonte de fósforo no meio de cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* foi limitada, devido a alterações enzimáticas no metabolismo celular.

A limitação de fósforo também pode ter influenciado a obtenção de extrato com menor tensão superficial ($30,5 \text{ mN.m}^{-1}$) (Tabela 2) em cultivo realizado com a *Spirulina platensis* LEB 52, pois obteve-se extrato com menor tensão superficial em cultivo realizado sem adição de fósforo e com 412 mg.L^{-1} de nitrogênio.

Tabela 2 - Tensão superficial (TS), Índice de emulsificação (I) e diâmetro médio (D) das gotículas após 15 d das emulsões preparadas a partir dos extratos e com 10% de óleo girassol.

Microalga	Ensaio	Variável		TS (mN.m^{-1})	I (%)	D (μm)
		Fósforo (mg.L^{-1})	Nitrogênio (mg.L^{-1})			
<i>Spirulina</i> LEB 18	1	0 (-1)	0 (-1)	26,7	64,9	2,12
	2	114 (+1)	0 (-1)	29,9	67,2	2,15
	3	0 (-1)	412 (+1)	34,6	70,3	1,87
	4	114 (+1)	412 (+1)	36,3	72,0	2,08
	5	57 (0)	206 (0)	30,5	59,8	2,11
	6	57 (0)	206 (0)	32,9	59,2	2,09
	7	57 (0)	206 (0)	31,7	60,3	2,06
<i>Spirulina</i> LEB 52	8	0 (-1)	0 (-1)	35,9	64,6	1,17
	9	114 (+1)	0 (-1)	35,4	68,6	2,07
	10	0 (-1)	412 (+1)	30,5	65,3	2,10
	11	114 (+1)	412 (+1)	33,7	62,7	2,18
	12	57 (0)	206 (0)	34,3	63,2	2,14
	13	57 (0)	206 (0)	33,1	63,5	2,10
	14	57 (0)	206 (0)	33,7	63,3	2,12

Os valores de tensão superficial obtidos neste artigo foram inferiores aos encontrados no artigo 1, provavelmente devido ao diferente método de ruptura celular utilizado, sendo que neste artigo foi utilizado o método ultrassônico. Conforme verificado no artigo 2, o método ultrassônico mostrou-se mais eficiente quando em comparação com o método de esferas de vidro utilizado no artigo 1. O solvente utilizado na extração dos

biossurfactantes também foi diferente, sendo neste artigo utilizado etanol e no artigo 1 metanol. Neste caso o etanol em conjunto com o método de ruptura celular utilizado pode ter ocasionado extração com maior concentração de compostos de superfície ativa.

A capacidade dos biossurfactantes de formar emulsões geralmente é determinada pelo índice de emulsificação, sendo este um importante parâmetro de avaliação (COOPER e GOLDENBERG, 1987). Neste trabalho foram atingidos valores superiores a 59% (Tabela 2).

De acordo com os resultados obtidos, como foram adicionados 60% (v/v) de óleo de girassol nas formulações, pode-se verificar pelo índice de emulsificação que todo o óleo foi emulsionado nas diferentes emulsões obtidas. Porém, as concentrações utilizadas de nitrogênio e fósforo não apresentaram influência significativa nesta resposta para ambas microalgas.

Barros, Quadros e Pastore (2008) em estudo realizado com biossurfactante produzido a partir de *Bacillus subtilis* obtiveram índice de emulsificação em torno de 70% após 24 h quando foi utilizado óleo girassol.

Em relação ao diâmetro médio de gotículas obtidos para as emulsões, formadas a partir de extratos oriundos das microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18 e com 10% de óleo girassol, foi constatado variação entre 1,17 e 2,18 μm (Tabela 2).

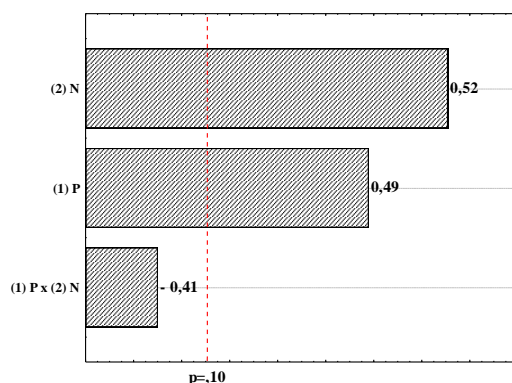
Como apresentado na Tabela 2, a emulsão formada a partir do extrato da microalga *Spirulina platensis* LEB 18, cujo cultivo foi realizado com a maior concentração de nitrogênio (412 mg.L^{-1}) e sem adição de fósforo (Ensaio 3), apresentou menor diâmetro de gotícula (1,87 μm).

Para a microalga *Spirulina platensis* LEB 52, a condição de cultivo que resultou em emulsão com menor diâmetro de gotícula (1,17 μm) (Ensaio 8) procedeu-se sem adição de nitrogênio e fósforo (Tabela 2), sendo que ambos nutrientes apresentaram influência significativa para esta resposta (Figura 1).

As emulsões formadas a partir de extratos oriundos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52 apresentaram menor tamanho de gotícula quando as microalgas foram cultivadas com a maior concentração e sem adição de nitrogênio no meio de cultivo, respectivamente. Com isso, os extratos de biossurfactantes utilizados na formação dessas emulsões podem apresentar composições diferentes. O extrato obtido a partir da *Spirulina* sp. LEB 18 pode conter substâncias que apresentam proteínas em sua composição, pois de acordo com Santos, Macedo e Alegre (2003) quando esta microalga é cultivada com maior concentração de nitrogênio seu metabolismo tende a se direcionar para produção de proteínas.

Já o extrato obtido a partir da *Spirulina platensis* LEB 52 pode apresentar em sua composição substâncias formadas por lipídios e carboidratos, pois segundo Macedo e Alegre (2001) baixas concentrações de nitrogênio no meio de cultivo de *Spirulina* favorecem o acúmulo de lipídios e carboidratos nas células.

Figura 1 - Diagrama de efeito das variáveis concentração de fósforo e nitrogênio sobre o diâmetro médio das gotículas presentes nas emulsões formadas a partir de extratos oriundos da microalga *Spirulina platensis* LEB 52.



Todas as emulsões preparadas com 10% de óleo apresentaram cremeação e algumas, separação de óleo. De acordo com Aulton (2005) a cremeação ocorre quando a fase dispersa é mais densa que a contínua, formando assim uma camada de emulsão mais concentrada na parte superior da emulsão.

A Figura 2 apresenta as emulsões (Ensaio 3 e 8) que foram elaboradas com 10% de óleo girassol após 15 d de preparo, onde pode ser observada a formação de cremeação nas emulsões (Figura 2a e 2b), bem como separação de óleo na emulsão formada a partir de extrato oriundo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 (Figura 2b).

Figura 2 - Emulsões formadas com 10% de óleo girassol obtidas a partir de extratos provenientes das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (a) e *Spirulina platensis* LEB 52 (b).



A partir dos resultados obtidos no do Delineamento Fatorial Completo 2^2 para as microalgas, foram realizadas análise de variância para as respostas tensão superficial dos

extratos e diâmetro médio das gotículas das emulsões obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos oriundos de *Spirulina platensis* LEB 52 (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de variância para tensão superficial dos extratos (TS-SL18), diâmetro médio das gotículas das emulsões (D-SL18) obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos (TS-SL52) oriundos de *Spirulina platensis* LEB 52.

Respostas	Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
TS-SL18	Regressão	56,6013	2	28,3007	31,26	4,32
	Resíduos	3,6216	4	0,9054		
	Total	60,2229	6			
D-SL18	Regressão	0,0481	3	0,0160	16,00	5,39
	Resíduos	0,0030	3	0,0010		
	Total	0,0511	6			
TS-SL52	Regressão	17,9842	3	5,9947	26,34	5,39
	Resíduos	0,6827	3	0,2276		
	Total	18,6669	6			

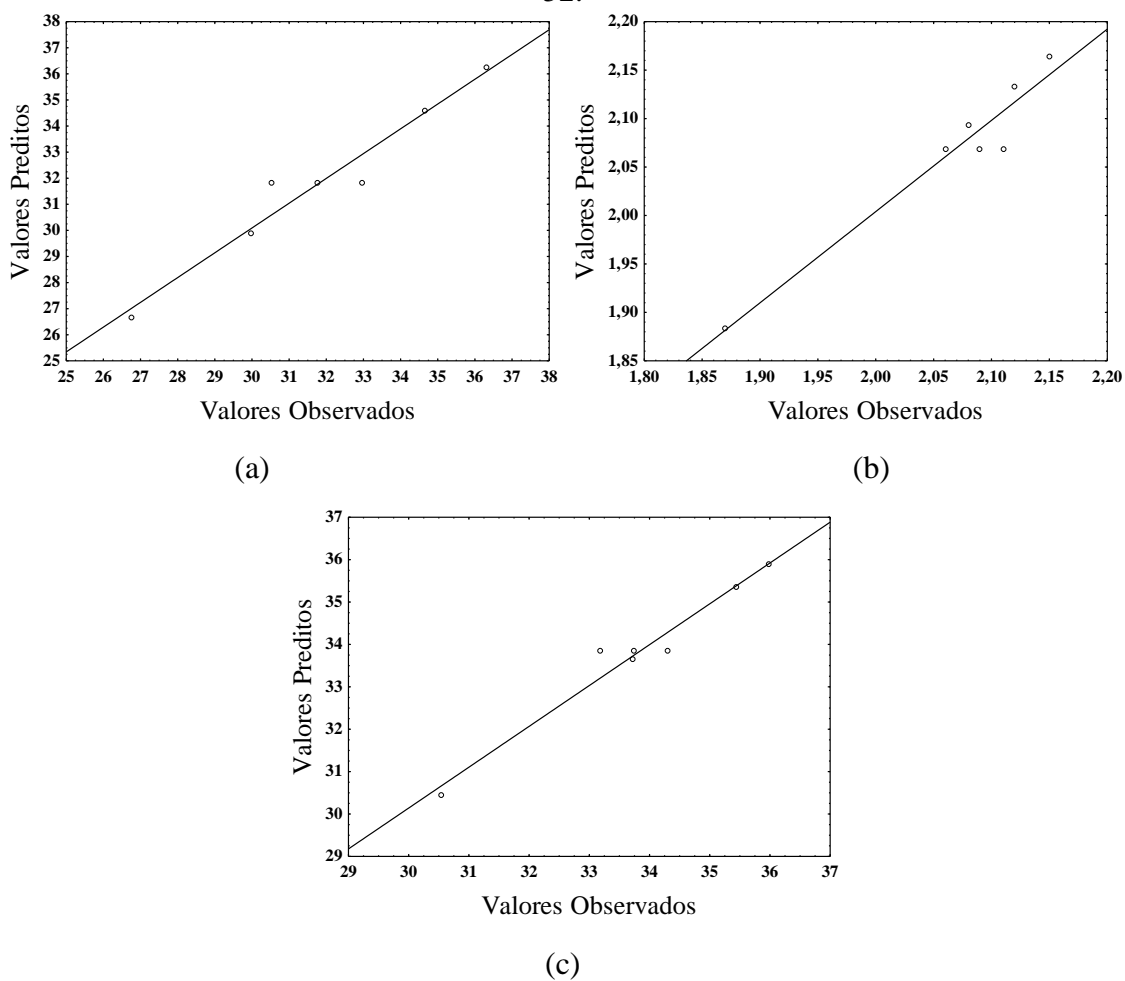
De acordo com a análise de variância (Tabela 3), os dados experimentais de tensão superficial dos extratos e diâmetro médio das gotículas das emulsões obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos de *Spirulina platensis* LEB 52 se ajustaram aos modelos. Esses modelos, representados pelas variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) (Tabela 4), foram válidos estatisticamente devido aos F calculados terem sido superiores aos F tabelados (BRUNS; NETO; SCARMINIO, 2010).

Tabela 4 - Equações e coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir dos modelos para tensão superficial dos extratos e diâmetro médio das gotículas das emulsões obtidas a partir das microalgas.

Microalga	Resposta	Equação	R^2
<i>Spirulina</i>	TS (mN.m^{-1})	$31,85 + (1,22.P) + (3,56.N)$	0,9500
sp. LEB 18	D (μm)	$2,07 + (0,06.P) - (0,08.N) + (0,05.P.N)$	0,9415
<i>Spirulina platensis</i> LEB 52	TS (mN.m^{-1})	$33,84 + (0,66.P) - (1,79.N) + (0,94.P.N)$	0,9634

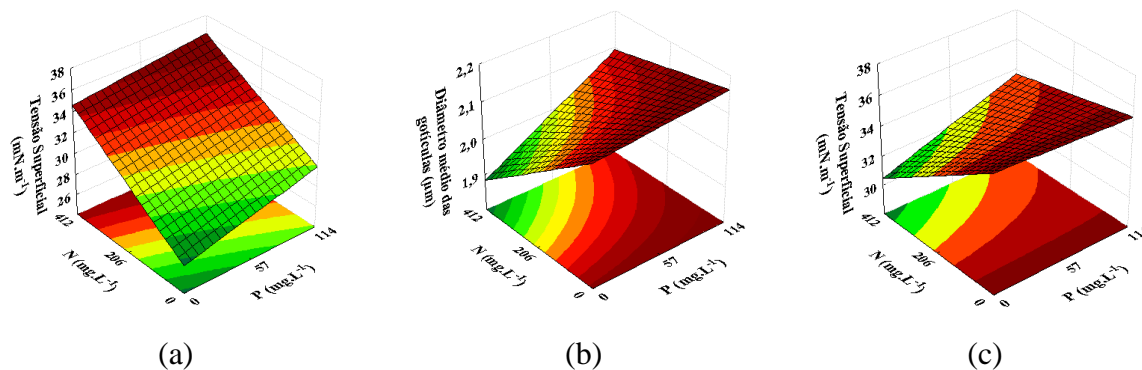
Os modelos obtidos para tensão superficial dos extratos e diâmetro médio das gotículas das emulsões obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos oriundos de *Spirulina platensis* LEB 52 apresentaram alta qualidade de ajuste conforme pode ser observado na Figura 3, sendo que quanto mais os dados se ajustam à reta identidade, melhor é a qualidade do ajuste.

Figura 3 – Valores observados x Valores preditos pelos modelos para tensão superficial dos extratos (a) e diâmetro médio das gotículas das emulsões (b) obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos (c) oriundos de *Spirulina platensis* LEB 52.



Considerando que os modelos, os quais apresentaram alta qualidade de ajuste foram válidos para as variáveis respostas, os mesmos foram utilizados para gerar as superfícies de resposta (Figura 4).

Figura 4 - Superfícies de resposta geradas a partir do modelo obtido para tensão superficial dos extratos (a), diâmetro médio das gotículas das emulsões (b) obtidas a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 e tensão superficial dos extratos (c) oriundos de *Spirulina platensis* LEB 52.



A partir da Figura 4a, pode-se verificar que quando *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada sem adição de nitrogênio e fósforo obteve-se extrato que apresentou menor valor de tensão superficial ($26,7 \text{ mN.m}^{-1}$) (Tabela 2). Já para a microalga *Spirulina platensis* LEB 52, o extrato com menor tensão superficial ($30,5 \text{ mN.m}^{-1}$) (Tabela 2) foi obtido quando esta foi cultivada com maior concentração de nitrogênio (412 mg.L^{-1}) e sem adição de fósforo (Figura 4c).

A eficiência de biossurfactantes pode ser incrementada quanto tem-se menores valores de tensão superficial, pois de acordo com Mulligan (2005) um bom surfactante pode diminuir a tensão superficial da água de $72,0$ para $35,0 \text{ mN.m}^{-1}$. Neste trabalho foram obtidos extratos a partir de ambas microalgas, os quais apresentaram tensão superficial abaixo de $36,3 \text{ mN.m}^{-1}$, indicando assim a produção de biossurfactantes.

O extrato obtido a partir da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou valor de tensão superficial ($26,7 \text{ mN.m}^{-1}$) similar ao relatado por Wei et al. (2003) na produção de surfactina, a qual é um dos mais efetivos biossurfactantes, sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN.m^{-1} .

De acordo com a Figura 4b, pode-se observar que foi obtida emulsão com menor diâmetro de gotículas a partir da microalga *Spirulina platensis* LEB 18 quando foi utilizado extrato oriundo de cultivo realizado com maior concentração de nitrogênio (412 mg.L^{-1}) e sem adição de fósforo (Ensaio 3).

Emulsões que apresentam menor tamanho de gotículas, geralmente apresentam maior estabilidade (OLIVEIRA, 2008). De acordo com Tadros et al. (2004) o pequeno

tamanho das gotas dificulta a formação de cremeação e a maturação de Ostwald, que pode ocasionar a desestabilização de emulsões.

Com base no que foi relatado e com propósito de obter emulsões com tamanho de gotículas menor ainda, procurando assim evitar a formação de cremeação e separação de fases, foram utilizados os extratos obtidos a partir dos Ensaios 3 e 8 na formulação de novas emulsões.

Estes mesmos extratos, obtidos nos Ensaios 3 e 8, que formaram emulsões com menor diâmetro de gotículas, não apresentaram menor tensão superficial quando comparados com os demais ensaios. Provavelmente os extratos obtidos dos Ensaios 3 e 8 continham moléculas de maior massa molecular como: polissacarídeos, proteínas, lipoproteínas, que são mais eficientes na estabilidade de emulsões. De acordo com Ron e Rosenberg (2001), biossurfactantes de alta massa molecular são mais efetivos para estabilizar emulsões óleo/água, enquanto que os de baixa massa molecular reduzem as tensões superficiais e interfaciais. Neste caso, as emulsões óleo em água são estabilizadas devido ao polissacarídeo liberado no meio de cultivo se ligar à proteína que é hidrofóbica formando assim um eficiente bioemulsificador.

As emulsões obtidas a partir de extratos oriundos dos Ensaios 3 e 8, preparadas com 0,1% de óleo girassol e velocidade de agitação 24000 rpm durante 30 min, apresentaram gotículas com menores tamanho de diâmetro, entre 578 nm e 554 nm, respectivamente (Tabela 5). Com isso podem ser classificadas como nanoemulsões, sendo que o menor tamanho de gotas obtido deve ter sido decorrente do maior tempo e velocidade de agitação quando em comparação com as emulsões formadas com velocidade de 13500 rpm durante 5 min.

Conforme pode-se observar na Tabela 5 houve redução do tamanho de gotículas ao longo do tempo em ambas nanoemulsões (Ensaios 3 e 8), este fato pode ter ocorrido devido a uma adsorção gradativa de biossurfactantes na interface das gotículas, propiciando espessamento e maior rigidez do filme interfacial, o que pode ter causado compressão e redução no tamanho das gotículas. De acordo com Langevin et al. (2004), a adsorção de surfactantes na interface das gotículas determina seu tamanho, devido à relação com a redução da tensão interfacial. Com uma quantidade maior de surfactante adsorvido, a estabilidade da nanoemulsão é aumentada.

O valor do pH também é um importante parâmetro de monitoramento da estabilidade de nanoemulsões, pois alterações neste parâmetro indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de

nanoemulsões formuladas com óleos vegetais, uma diminuição no valor do pH pode ser decorrente da hidrólise de ácidos graxos, gerando ácidos graxos livres (MARTINI, 2005).

De acordo com a Tabela 5, pode-se perceber que houve redução no valor de pH ao longo do tempo na nanoemulsão formada quando foi utilizado extrato proveniente de *Spirulina* sp. LEB 18 (Ensaio 3).

Porém, esta mesma nanoemulsão apresentou potencial zeta de -35,6 mV. Segundo Roland et al. (2003), quando têm-se valor em módulo acima de 30 mV as forças repulsivas predominam em relação às atrativas, fazendo com as gotículas fiquem dispersas no sistema, sendo indicativo de estabilidade. Com isso, embora na nanoemulsão do extrato de *Spirulina* sp. LEB 18 tenha ocorrido diferença significativa ($p < 0,5$) entre os valores de pH com o decorrer do tempo, esta mudança não interferiu na estabilidade da nanoemulsão durante o período avaliado.

Tabela 5 - Diâmetro médio (D) das gotículas e pH das nanoemulsões obtidas a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52 no período de 1, 15 e 30 d.

Microalga	Período (d)	D (nm)	pH
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 Ensaio 3	1	601 ± 2,7 ^a	9,3 ± 0,2 ^a
	15	615 ± 2,1 ^b	8,8 ± 0,1 ^b
	30	578 ± 3,6 ^c	7,0 ± 0,3 ^c
<i>Spirulina platensis</i> LEB 52 Ensaio 8	1	584 ± 4,7 ^a	6,6 ± 0,1 ^a
	15	575 ± 5,8 ^a	6,2 ± 0,4 ^a
	30	554 ± 11,3 ^b	6,3 ± 0,2 ^a

*Resultados com letras iguais na mesma coluna não diferiram entre si, enquanto com letras diferentes apresentaram diferença significativa ao nível de 95% de confiança pelo teste de Tukey.

A nanoemulsão preparada com extrato de *Spirulina platensis* LEB 52 (Ensaio 8) (Tabela 5) também apresentou comportamento estável frente às condições testadas. Os valores de pH não apresentaram diferença significativa ($p > 0,5$) e o valor do potencial zeta foi -36,6 mV, sendo em módulo, acima 30 mV.

De acordo com a Figura 5, a partir da análise visual, pode-se observar que ambas nanoemulsões formadas com 0,1% de óleo girassol e velocidade de agitação 24000 rpm durante 30 min apresentaram-se uniformes e sem formação de cremação e separação de fases.

Figura 5 - Nanomulsões formadas com 0,1% de óleo girassol obtidas a partir de extratos proveniente das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 (a) e *Spirulina platensis* LEB 52 (b).



Vários fatores podem ter contribuído para a obtenção de nanoemulsões com essas características, como por exemplo, a redução da concentração de óleo na formulação, pois à medida que se aumenta o teor de óleo, aumenta-se a quantidade de gotas de óleo existentes. Com isso, segundo Chang et al. (2006) a concentração insuficiente de surfactante para estabilizar as gotas de óleo pode ocasionar o aumento de tamanho das gotas, diminuindo assim a estabilidade da nanoemulsão.

Outros fatores, como a velocidade e o tempo de agitação também podem influenciar no tamanho de gotículas, pois pesquisadores verificaram redução do tamanho de gotículas com o aumento do tempo e velocidade de agitação, devido à maior quantidade de energia empregada no processo (MEZADRI, 2010; SCHAFFAZICK, 2006).

4 CONCLUSÕES

Os extratos obtidos a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52 apresentaram tensão superficial abaixo de $36,3 \text{ mN.m}^{-1}$, indicando a produção de biossurfactantes. Sendo que a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou extrato com menor tensão superficial ($26,7 \text{ mN.m}^{-1}$) em cultivo realizado sem adição de fósforo e nitrogênio. Em relação ao índice de emulsificação foram atingidos valores superiores a 59%, porém as concentrações utilizadas de nitrogênio e fósforo não apresentaram influência significativa nesta resposta para ambas microalgas.

As nanoemulsões formadas a partir de extratos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52 apresentaram-se estáveis por até 30 d com diâmetro médio de gotículas entre 554 e 615nm.

Os resultados obtidos neste trabalho são favoráveis a pesquisas na aplicação tanto dos extratos microalgais como das nanoemulsões obtidas em diversos processos industriais, como nas áreas ambiental, farmacêutica, cosmética e alimentos.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, A. W., GAST, A. P., **Physical Chemistry of Surfaces**, 6 ed., New York John Wiley & Sons, Inc., 1997.

ALLEN, T. **Powder Sampling and Particle Size Determination**. Elsevier. 682 p., 2003.

ALMEIDA, T. C. A. **Avaliação da Estabilidade de Emulsões Concentradas em Bebidas**. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2012.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. 677p. In: FRANGE, R.C. C; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, p. 263-271, 2009.

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

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 975-985, 2008.

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.

BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M. A.; MORAES, I. O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source, **Journal of Food Engineering**, v. 54, 283-288, 2002.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BRUNS, R.E.; NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S. **Como fazer experimentos**. Porto Alegre. 4.ed. Editora Artmed, p. 414, 2010.

CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CAI, M.; MASAKORALA, K.; JAIN, A. K.; CHOI, M. M. F. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. **Fuel**, v. 122, p. 140-148, 2014.

CHANG, C. B.; GRAVES, S. M.; MASON, T. G.; MELESON, K.; WILKING, J. N. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. 636-664, 2006.

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

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 439 - 442, 2001.

DELGADO, A. V.; GONZÁLEZ-CABALLERO, F.; HUNTER, R. J.; KOOPAL, L. K.; LYKLEMA, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, p. 194-224, 2007.

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

FDA. **Food and Drug Administration** (2002). Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>>. Acesso: outubro de 2010.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A.E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. **Algal Nutrition**. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Mass Culture. Boston: CRC Press, 1990.

LANGEVIN, D.; POTEAU, S.; HÉNAUT, I.; ARGILLIER, J. F. Crude Oil Emulsion Properties and their Application to Heavy Oil Transportation. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 59, p. 511-521, 2004.

LOURENÇO S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima. 606p, 2006.

MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em dois níveis de temperatura. Parte II: Produção de lipídios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 183-186, 2001.

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

MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2005.

MEZADRI, H. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos**. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil, 2010.

MIRHOSSEIN, H.; PING TAN, C.; HAMIDB, N.; YUSOF, S. Modeling the Relationship between the main emulsion components and stability, viscosity, fluid behavior, zeta potential, and electrophoretic mobility of orange beverage emulsion using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7659-7666, 2007.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B. F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 199-209, 1989.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Campinas: Editora Unicamp. 299 p., 1995.

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

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa Guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes Aegypti***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, Brasil, 2008.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2011.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil in water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

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

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 1-5, 2013.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas - Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 17-21, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina**. 276f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2006.

VELIKONJA, J., KOSARIK, N. **Biossurfactants en Food Application**. In: KOSARIC, N. (Ed.) Biosurfactants: production, properties, applications. New York: CRC Press, 1, p. 65-98, 1993.

WEI, Y. H.; WANG, L. F.; CHANG, J. S. KUNG, S. S. Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 174-178, 2003.

ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES

5 CONCLUSÃO GERAL

Embora a microalga *Spirulina platensis* LEB 52 tenha apresentado melhores resultados de produção de biomassa, quando em comparação com as microalgas *Spirulina platensis* Paracas e *Spirulina* sp. LEB 18, não obteve extratos de biossurfactantes com baixa tensão superficial quando foi utilizado metanol na extração.

As variáveis fósforo e nitrogênio não apresentaram influência significativa na concentração máxima e produtividade máxima de *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina* sp. LEB 18. Já para a microalga *Spirulina platensis* Paracas, verificou-se dentre os cultivos realizados desta microalga, o que proporcionou maior valor de concentração máxima de biomassa ($0,95 \text{ g.L}^{-1}$) e produtividade máxima ($0,191 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi realizado com maior concentração de fósforo (114 mg.L^{-1}) e sem adição de nitrogênio.

O método de ultrassonicação mostrou-se ser mais eficiente na ruptura celular das microalgas *Spirulina platensis* Paracas e *Spirulina* sp. LEB 18, devido à obtenção de extratos com menor tensão superficial quando comparado ao uso de esfera de vidro.

A partir deste estudo foi verificada produção intracelular de biossurfactantes pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* Paracas, sendo que o menor valor de tensão superficial ($26,7 \text{ mN.m}^{-1}$) foi verificado quando foi utilizado etanol para obtenção do extrato oriundo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 quando esta foi cultivada em fotobiorreatores verticais e sem adição de nitrogênio e de fósforo. Com isso torna-se interessante o estudo de diferentes microalgas e condições de cultivo visando incrementar a produção de biossurfactantes por microalgas.

A partir de extratos provenientes das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Spirulina platensis* LEB 52 foram obtidas nanoemulsões estáveis por até 30 d, com diâmetro médio de gotículas entre 532 e 615 nm. As nanoemulsões obtidas, por apresentarem tamanho reduzido de gotículas e apresentarem estabilidade por pelo menos 30 d, apresentam potencialidade de uso na melhora da biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade de diferentes compostos, principalmente nas áreas de alimentos, farmacêutica, cosmética.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Analisar o processo de separação e identificar os tipos de biossurfactantes produzidos pelas microalgas;

Avaliar o potencial de aplicação dos extratos microalgais como estabilizantes, antimicrobianos e na biorremediação de ambientes contaminados;

Estudar outros tipos de homogeneizadores no preparo das emulsões, como os de alta pressão e ultrassônico;

Avaliar o potencial de aplicação das nanoemulsões formadas com extratos microalgais na melhora de biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade de diferentes compostos.

CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p. 143-151, 2008.
- ADAMSON, A. W., GAST, A. P., **Physical Chemistry of Surfaces**, 6 ed., New York John Wiley & Sons, Inc., 1997.
- ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P; AGBOOLA, S. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering**, v. 122, p. 15-27, 2014.
- ALLEN, T. **Powder Sampling and Particle Size Determination**. Elsevier. 682 p., 2003.
- ALMEIDA, T. C. A. **Avaliação da Estabilidade de Emulsões Concentradas em Bebidas**. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2012.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J.A.V. Outdoor and indoor cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63, p. 85-90, 2008.
- ANITHA, L.; CHANDRALEKH, K. Effect of supplementation of *Spirulina* in blood glucose, Glycosylated Hemoglobin and Lipid Profile of Male NonInsulin Dependent Diabetics. **Asian Journal Experimental Biological Science**, v. 1, p. 36-46, 2010.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.
- ARAÚJO, M. M. S. **Estudo de quebra de emulsões de petróleo utilizando microemulsões e célula de desidratação eletrostática**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNANDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 99-109, 2012.
- AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2005. 677p. In: FRANGE, R.C. C; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p. 263-271, 2009.
- BANAT, I. N.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 975-985, 2008.

BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; FRANCO, J. M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, p. 164-173, 2013.

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.

BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M. A.; MORAES, I. O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source, **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.

BIGOGNO, C.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. **Phytochemistry**, v. 60, p. 497-503, 2002.

BINAGHI, L.; BORGHI, A.D.; LODI, A.; CONVERTI, A.; BORGHI, M.D. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1341-1346, 2003.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BOROWITZKA, M. A. **Algal growth media and sources of culture**. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J., eds, *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 456-465, 1988.

BOUWMEESTER, H.; DEKKERS, S.; NOORDAM, M. Y.; HAGENS, W. I.; BULDER, A. S.; HEER, C. VOORDE, S. E. C. G.; WIJNHOFEN, S. W. P.; MARVIN, H. J. P.; SIPS, A. J. A. M. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 52-62, 2009.

BRANGER, B.; CADUDAL, J. L.; DELOBEL, M.; OUOBA, H.; YAMEOGO, P.; OUEDRAOGO, D.; GUERIN, D.; VALEA, A.; ZOMBRE, C.; ANCEL, P. *Spirulina* as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. **Archives de pédiatrie**, v. 10, p. 424-431, 2003.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, p. 849-854, 2009.

BRUNS, R.E.; NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S. **Como fazer experimentos**. Porto Alegre. 4.ed. Editora Artmed, p. 414, 2010.

- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure Applied Chemistry**, v. 82, p. 97-116, 2010.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.
- CAMPO, J. A. D.; GONZÁLEZ, M. G.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.1163-1174, 2007.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid Interfacial Sciences**, v. 107, p. 125-155, 2004.
- CARVALHO, L. F. **Desenvolvimento de novos alimentos para praticantes de atividade física, adicionados ou não de *Spirulina***. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2010.
- CASAS, J.; OCHOA, F. G. Sphorolipid Production by *Candida bombicola*: Medium Composition and Culture Methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, 488-494, 1999.
- CATALDO, D. A.; HARRON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CERQUEIRA, V. S. Produção de biossurfactantes e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2007.
- CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 659–664, 2012.
- CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CAI, M.; MASAKORALA, K.; JAIN, A. K.; CHOI, M. M. F. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. **Fuel**, v. 122, p. 140-148, 2014.
- CHANG, C. B.; GRAVES, S. M.; MASON, T. G.; MELESON, K.; WILKING, J. N. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, p. 636-664, 2006.
- CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 461-465, 2004.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in fuel studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.
- COHEN, Z. **The chemicals of *Spirulina***. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489–1493, 2007.

COLOMBO, P.; BRIANÇON, S.; LIETO, J.; FESSI, H. Project, Design and Use of a Pilot Plant for Nanocapsule Production. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, p. 1063-1072, 2001.

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

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Kinetics and energetics of photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 59, p. 155-223, 1998.

COSTA, E. Produção e avaliação das propriedades de biossurfactantes produzido em fermentação fúngica em estado sólido. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2004.

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p. 439 - 442, 2001.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 429-436, 2006.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 327p., 2011.

DARVISHI, P.; AYATOLLAHI, S.; MOWLA, D.; NIAZI, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 292-300, 2011.

DASTGHEIB, S. M. M.; AMOOZEGAR, M. A.; ELAHI, E.; ASAD, A.; BANAT, I. M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 263–70, 2008.

DELGADO, A. V.; GONZÁLEZ-CABALLERO, F.; HUNTER, R. J.; KOOPAL, L. K.; LYKLEMA, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, p. 194–224, 2007.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. DE; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n.6, p. 1959-1967, 2006.

DESAI, J. D.; BANAT, M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47–64, 1997.

- DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Production of biosurfactants**. In: KOSARIC, N. (Ed.) *Biosurfactants: production, properties, applications*. New York: CRC Press, 1, p. 65-98, 1993.
- DILLON, J. C.; PHUN, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional value of the algae *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 77, p. 32–46, 1995.
- DISMUKES, G.C. ; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G. M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion Biotechnology**, n.19, p. 235-240, 2008.
- DONIO, M. B. S.; RONICA, S. F. A.; VIJI, V. T.; VELMURUGAN, S.; JENIFER, J. A.; MICHAELBABU, M.; CITARASU, T. Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 876-883, 2013.
- DOULAH, M. S. Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 649-660, 1977.
- DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHRAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 368-374, 2012.
- ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1525-1536, 2008.
- ESPUNY, M.J.; EGIDO, S.; RODÓN, I.; MANRESA, A.; MERCANDÉ, M.E. Nutritional requirements of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp 51T7. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 521-526, 1996.
- FDA. **Food and Drug Administration** (2002). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: outubro de 2010.
- FERNANDEZ, P.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; STRINGHETA, P. C.; CHAVES, A. Nano-emulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, p. 1860-1870, 2009.
- FONTES G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biosurfactantes por levedura. **Química Nova**, v. 31, p. 2091-2099, 2008.
- FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLES, C.; AND SOLANS, C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at Constant temperature. **Langmuir: the ACS journal os surfaces and colloids**, v. 17, p. 2076-2083, 2001.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Editora Atheneu. 182p. 2008.

GAD, A. S., KHADRAWY, Y. A., EL-NEKEETY, A. A., MOHAMED, S. R., HASSAN, N. S., ABDEL-WAHHAB, M. A. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. **Nutrition**, v. 27, p. 582–589, 2011.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428-1439, 2004.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Placing microalgae on the biofuels priority list: A review of the technological challenges. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, p. 703-726, 2010.

GRIMA, E.M.; SEVILLA, J.M.F.; PEREZ, J.A.S.; CAMACHO, F.G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 59–69, 1996.

GUALANDI, C.; WHITE, L. J.; CHEN, L.; GROSS, R. A.; SHAKESHEFF, K. M.; HOWDLE, S. M.; SCANDOLA, M. Scaffold for tissue engineering fabricated by non-isothermal supercritical carbon dioxide foaming of a highly crystalline polyester. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 130-136, 2010.

GUDINA, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEM, S; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 667-675, 2013.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 709-732, 2012.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* – Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2, 1994.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423 – 434, 2002.

HU, Q. **Environmental effects on cell composition**. In Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Edited by: Richmond A. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. p. 83-93, 2004.

JIMENEZ, C.; COSSIO, B.R.; LABELLA, D.; NIELL, F.X. The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, p. 179–190, 2003.

KANDADI, P.; SYED, M. A.; GOPARABOINA, S.; VEERABRAHMA, K. Albumin coupled lipid nanoemulsions of diclofenac for targeted delivery to inflammation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 1162–1171, 2012.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A. E. DUBINSKY, Z. AARONSON, S. Algal nutrition In RICHMOND, A. (Ed) **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 147-198, 1986.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A.E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. **Algal Nutrition**. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Mass Culture. Boston: CRC Press, 1990.

KIM, H. S.; JEON, J. W.; KIM, B. H.; AHN, C. Y.; MOCK OH, H.; YOON, B. D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 391-396, 2006.

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

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, p. 21- 43, 2012.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D. P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoidum* grown on dairy industry wastewater. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 499-503, 2013.

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

LANGEVIN, D.; POTEAU, S.; HÉNAUT, I.; ARGILLIER, J. F. Crude Oil Emulsion Properties and their Application to Heavy Oil Transportation. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 59, p. 511-521, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2a.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LI, Y.; HOSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 815-820, 2008.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LOURENÇO S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: Rima. 606p, 2006.

LU, W.; NESS, J. E.; XIE, W.; ZHANG, X.; MINSHULL, J.; GROSS, R. A. Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, p. 15451-15455, 2010.

MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em dois níveis de temperatura. Parte II: Produção de lipídios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 183-186, 2001.

MADKOUR, F. F.; KAMIL, A. E.; NASR, H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 38, p. 51-57, 2012.

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

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6 (2), p. 1-37, 2009.

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

MARKOU, G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under various amounts of limited phosphorus. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 533–535, 2012.

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M. FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 154–159, 2014.

MARTI, M. E.; COLONNA, W. J.; PATRA, P.; ZHANG, H.; GRENN, C.; REZNIK, G.; PYNN, M.; JARRELL, K.; NYMAN, J. A.; SOMASUNDARAN, P.; GLATZ, B.E.; LAMSAL, B.P. Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 31-39, 2014.

MARTINI, E. **Naonoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2005.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MENDES, R. L.; REIS, A. D.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of α -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. **Food Chemistry**, v. 99, p. 57–63, 2006.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, J. I.; NUNES, I. L. Prospecção Tecnológica da Utilização da *Spirulina platensis*. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, p. 44-52, 2012.

MEZADRI, H. **Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos**. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil, 2010.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 85-93, 2004.

MILLER, S. R.; MARTIN, M.; TOUCHTON, J.; CASTENHOLZ, R. W. Effects of nitrogen availability on pigmentation and carbon assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain sh-94-5. **Archives of Microbiology**, v. 177, p. 392-400, 2002.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina máxima*, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1075-1079, 1998.

MIRHOSSEIN, H.; PING TAN, C.; HAMIDB, N.; YUSOF, S. Modeling the Relationship between the main emulsion components and stability, viscosity, fluid behavior, zeta potential, and electrophoretic mobility of orange beverage emulsion using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7659-7666, 2007.

MOHANTY, P.; SRIVASTAVA, M.; KRISHNA, K. B. **The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer**. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M., ANDRADE, M. R., TEIXEIRA, G. G., BRUSHCH, L. R. F., COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60-64, 2009.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ from synthetic combustion gas using cultivated microalgae in three-stage serial tubular photobioreactors. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 66, p. 313-318, 2011.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 129, p. 439-445, 2007.

MORAIS, M.G.; MIRANDA, M.Z.; COSTA, J.A.V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 323-328, 2006.

MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Mixotrophic growth of *Spirulina platensis* in fed-batch mode. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 1132-1138, 2005.

- MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B. F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 199 – 209, 1989.
- NAUTIYAL, P.; SUBRAMANIAN, K. A.; DASTIDAR, M. G. Production and characterization of biodiesel from algae. **Fuel Processing Technology**, v. 120, p. 79-88, 2014.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Campinas: Editora Unicamp. 299 p., 1995.
- NGUYEN, T. T. L.; EDELEN, A.; NEIGHBORS, B.; SABATINI, D. A. Biocompatible lecithin-based microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: Formulation and potential applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 348, p. 498-504, 2010.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 252-259; 2007.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.
- OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa Guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes Aegypti***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, Brasil, 2008.
- OUZINEB, K.; LORD, C.; LESAUZE, N.; GRAILLAT, C.; TANGUY, P. A.; MCKENNA, T. Homogenisation devices for the production of miniemulsions. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 2994–3000, 2006.
- PANE, L.; SOLISIO, C.; LODI, A.; MARIOTTINIA, G.L.; CONVERTI, A. Effect of extracts from *Spirulina platensis* bioaccumulating cadmium and zinc on L929 cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 121–126, 2008.
- PEY, C. M.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, p. 144-150, 2006.
- PINTO, M. H. Produção de biosurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2008.

- PRABAKARAN, P.; RAVINDRAN, A. D. A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 150-154, 2011.
- QIN, X.; KHUONG, A. C.; YU, Z.; DU, W.; DECATUR, J.; GROSS, R. A. Simplifying alternating peptide synthesis by protease-catalyzed dipeptide oligomerization. **Chemical Communications**, v. 49, p. 385-387, 2013.
- RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**. 153f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2011.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008.
- RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture**, v. 265, p. 118-126, 2007.
- RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low Cost Raw Materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.
- RAZA, Z. A.; REHMAN, A.; HUSSAIN, M. T.; MASOOD, R.; HAQ, A. U.; SADDIQUE, M. T.; JAVID, A.; AHMAD, N. Production of rhamnolipid surfactant and its application in bioscouring of cotton fabric. **Carbohydrate Research**, 2014.
- REICHERT, C.C.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23-28, 2006.
- RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd. 577p., 2004.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press, 1990.
- RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de Biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30, p. 1374-1380, 2007.
- ROBINS, M. M. Emulsions - creaming phenomena. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 265-272, 2000.
- RODRIGUES, L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 609-618, 2006.
- RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p.109-116, 2006.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil in water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

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

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 1-5, 2013.

SADAVA, D.; HILLIS, D.; HELLER, C. e BERENBAUM, M. **Life: The Science of Biology**, 8ª edição, W. H. FREEMAN, 2009. Citado por: RUSSO, D. A. M. T. Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura. 111f. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia). Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.

SAJILATA, M.G.; SINGHAL, R.S.; KAMAT, M.Y. Fractionation of lipids and purification of g-linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 109, p. 580–586, 2008.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Span 20/Tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 218, p. 241-254, 2003.

SANTOS, G. M.; MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas - Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 17-21, 2003.

SASSANO, C.E.N.; GIOIELLI, L.A.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 593–598, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade antioxidante de sistemas nano e microparticulados contendo melatonina**. 276f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2006.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2, São Paulo: Edgard Blücher, 254 p., 2001.

SIGEE, D. C. **Freshwater microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the freshwater environment**. 537p. England: John Wiley & Sons Ltda, 2005.

SILVA, A. P. F. S. **Eletroflotação não convencional aplicada à separação e ruptura celular de microalgas: Um avanço na viabilidade de geração de biodiesel**. 120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2013.

- SINGH A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.
- SLEIMAN, J.N.; KOHLHOFF, S. A.; ROBLIN, P. A.; WALLNER, S.; GROSS, R.; HAMMERSCHLAG, M. R.; BLUTH, M. H. Sophorolipids as antimicrobials agents. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 39, p. 60-63, 2009.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 145-149, 2004.
- SUN, L.; WANG, L.; ZHOU, Y. Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1206-1210, 2012.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.
- TOMASELLI, I. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis. ISBN 0-7484-0674-3, 1997.
- TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85-99, 2004.
- VASEL, D. Emulsificantes. **Food Ingredients Brasil**, n. 7, p. 62-72, 2009.
- VELIKONJA, J., KOSARIK, N. **Biosurfactants en Food Application**. In: KOSARIC, N. (Ed.) **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: CRC Press, 1, p. 65-98, 1993.
- VON RÜCKERT, G.; GIANI, A. Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 325-331, 2004.
- VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, Cell-biology and Biotechnology***, London: Taylor & Francis, 1997.
- WEI, Y. H.; WANG, L. F.; CHANG, J. S. KUNG, S. S. Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 174-178, 2003.
- WHANGA, L. M.; LIUC, P. W. G.; MAA, C. C. CHENGA, S. S. Application of biosurfactants, rhamnolipid and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 155-163, 2008.
- XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 77, p. 9-13, 2002.

ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophyce, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler.** *Ph.D. Thesis*, University of Paris, 1966.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 67-73, 2002.