



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Produção, extração, purificação e potencial atividade antimicrobiana do biossurfactante
produzido por *Bacillus safensis* MF326565 isolado de solo canavieiro

UBIRATAN RIBEIRO DA SILVA FILHO
Autor

DEMETRIUS ANTONIO MACHADO DE ARAÚJO
Orientador

João Pessoa
Abril - 2019

UBIRATAN RIBEIRO DA SILVA FILHO

Produção, extração, purificação e potencial atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 isolado de solo canavieiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-Mestrado (PGBiotecM) da Universidade Federal da Paraíba, como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

João Pessoa

Abril - 2019

F481p Filho, Ubiratan Ribeiro da Silva.

Produção, extração, purificação e potencial atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 isolado de solo canavieiro / Ubiratan Ribeiro da Silva Filho. - João Pessoa, 2019. 84 f. : il.

Orientação: Demetrius Antonio Machado de Araújo.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/Biotecnologia.

1. Biossurfactante. 2. *Bacillus safensis*. 3. Resíduos Agroindustriais. 4. Estabilidade. 5. Antimicrobiano. I. Araújo, Demetrius Antonio Machado de. II. Título.

UFPB/BC

UBIRATAN RIBEIRO DA SILVA FILHO

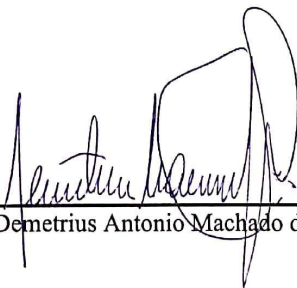
Produção, extração, purificação e potencial atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 isolado de solo canavieiro.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-Mestrado (PGBiotecM) da Universidade Federal da Paraíba como requisito à obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Data: 30 de abril de 2019

Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA:



Profº Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo (Orientador)



Profº Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (Examinador interno)



Profº Dr. Samuel Paulo Cibulski (Examinador externo)

“É o grau de comprometimento
que determina o sucesso e não o
número de seguidores.”

Remo Lupin

Dedico este trabalho àqueles que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Paraíba pela formação acadêmica, ao CNPq e a Capes pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa concedida.

À minha vó que sempre me apoiou em toda a minha trajetória, dentro e fora da Universidade. Uma mulher forte que foi mãe e pai nos momentos em que mais precisei. Devo tudo a ela.

À minha irmã Patrícia que apesar das nossas diferenças, sempre me ajudou e estava a todo tempo disponível. Agradeço e espero retribuir.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, inclusive aquelas que nos afastaram, mas que foi essencial para a conclusão deste ciclo. Agradeço em especial ao Wendisy que sempre me ajudou neste percurso de pós-graduação e que me deu muitos conselhos sobre a academia. Muito obrigado!

Aos meus amigos da iniciação científica que mesmo distante sempre estiveram presentes e me ajudaram de todas as formas. Agradeço em especial a Fernanda Mikainy, Carlos Vinícius, Andreza Henrique e a Rowse que foi minha confidente na iniciação. Meu muito obrigado!

Ao laboratório de Engenharia de Bioprocessos que me acolheu e que foi desencadeador de amizades que carregarei para minha vida, em especial a Adrielly Andrade, Napoleão e o Lucas Silva, muito obrigado pelos momentos inesquecíveis.

Ao Laboratório multiusuário e de microbiologia aplicada por todos os ensinamentos e companhia nos momentos mais difíceis deste período de mestrado, mas que possibilitou encontrar pessoas maravilhosas que eu não tenho palavras para agradecer. Meu muitíssimo obrigado a TCris, Renata e a Monalisa, tamo junto!

Ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM) que foi o catalisador de todas as ideias aqui apresentadas. Não tenho palavras pra agradecer o apoio, o aprendizado e os momentos ali vivenciados que jamais esquecerei. Agradeço ao Itácio, Aliny, Bruna, Fagner, Patrik, Brena, Lucas e Matheus.

Ao meu orientador e amigo, o professor Demétrius que sempre apoiou minhas decisões em todos os momentos e sempre acreditou em mim. Muito obrigado.

À professora Andréa Farias de Almeida por todo o suporte dado ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Samuel Cibulski que chegou no laboratório num momento crucial pois sua energia contagiou todos os trabalhos e o meu não foi diferente. Agradeço por todas as conversas, discussões, ideias, risadas e por toda a ajuda para o desenvolvimento do meu trabalho. Muito obrigado “tchê”.

A banca de defesa que aceitou o convite para avaliar meu trabalho. Agradeço aos professores Ian, Samuel, Adna e ao Itácio por se dispuserem a avaliar o meu trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Ubiratan Ribeiro ^ ^

RESUMO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas capazes de interagir com superfícies de diferentes polaridades e por serem derivados do petróleo, apresentam limitações e problemas associados ao seu uso, dentre estes, destacam-se os ambientais. Os biossurfactantes apresentam-se como alternativa pois demonstram características ambientalmente desejáveis que dependem do metabolismo dos organismos, associado a tecnologias que favoreçam sua produção. Neste contexto, destaca-se o uso do melaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de substrato. Diante deste exposto, o objetivo deste trabalho foi produzir biossurfactante em biorreator de bancada utilizando *Bacillus safensis*, MF326565, isolado de solo canavieiro e melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo. Os experimentos foram conduzidos preliminarmente em *shaker* (1 % de melaço de cana-de-açúcar e 1 % de extrato de levedura – p/v). O diagnóstico da produção de biossurfactante foi realizado por meio da análise de crescimento, tensão superficial e índice de emulsificação. Em biorreator, seguiram as mesmas análises, além da caracterização por FTIR e avaliação da atividade antimicrobiana. Os resultados do cultivo em *shaker* foram bastante satisfatórios quanto ao crescimento e a produção de biossurfactante, pois o microrganismo foi capaz de utilizar o substrato e produzir biossurfactante, que apresentou índice de emulsificação superior a 50 % em óleo de motor, além de apresentar redução da tensão superficial em 32 %. Em biorreator observou-se um crescimento de aproximadamente 3,0 g/L de biomassa e 1,5 g/L de biossurfactante e com emulsificação muito superior em óleo de motor, óleo vegetal e querosene. O biossurfactante apresentou estabilidade a variação de temperatura (15~60 °C), pH (2,0~8,0), salinidade (6~10 % de NaCl), além disso, a emulsificação permaneceu estável por mais de 15 dias. Os espectrogramas de infravermelho (FTIR) do produto purificado dos experimentos em biorreator apresentaram similaridade com o padrão surfactina, evidenciando sua natureza lipopeptídica. O biossurfactante apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. cereus*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *Acinetobacter* sp. com atividade bactericida em concentrações de 12,5 mg/mL para *Acinetobacter* sp. e *S. aureus* e concentrações menores que 3,0 mg/mL para os *Bacillus* utilizados neste estudo. Assim, conclui-se que o *Bacillus safensis*, MF326565, foi capaz de produzir biossurfactante a partir de um substrato alternativo (melaço de cana-de-açúcar) e que este apresentou eficácia na emulsificação de compostos hidrofóbicos, além de apresentar atividade biológica.

Palavras-chave: Biossurfactante. *Bacillus safensis*. Resíduos agroindustriais. Estabilidade. Antimicrobiano.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules capable of interacting with surfaces of different polarities and because they are derived from petroleum, they have limitations and problems associated with their use, among which environmental ones stand out. Biosurfactants are an alternative because they demonstrate environmentally desirable characteristics that depend on the metabolism of organisms, associated with technologies that favor their production. In this context, we highlight the use of sugarcane molasses as an alternative source of substrate. Therefore, the objective of this work was to produce biosurfactant in bench top bioreactor using *Bacillus safensis*, MF326565, isolated from sugarcane soil and sugarcane molasses as an alternative substrate. The experiments were carried out preliminarily in shaker (1% of sugarcane molasses and 1% of yeast extract - w / v). The diagnosis of biosurfactant production was made by growth analysis, surface tension and emulsification index. In bioreactor, they followed the same analyzes, besides the characterization by FTIR and evaluation of antimicrobial activity. The results of shaker cultivation were quite satisfactory regarding growth and biosurfactant production, since the microorganism was able to use the substrate and produce biosurfactant, which presented emulsification index higher than 50% in motor oil, besides presenting reduction. surface tension by 32%. In bioreactor a growth of approximately 3.0 g / l of biomass and 1.5 g / l of biosurfactant was observed and with much higher emulsification in motor oil, vegetable oil and kerosene. The biosurfactant showed stability at temperature (15 ~ 60 ° C), pH (2.0 ~ 8.0), salinity (6 ~ 10% NaCl), and emulsification remained stable for more than 15 days. Infrared spectrograms (FTIR) of the purified product from the bioreactor experiments showed similarity with the surfactin standard, showing its lipopeptide nature. The biosurfactant showed antimicrobial activity against *S. aureus*, *B. cereus*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *C. albicans* and *Acinetobacter* sp., bactericidal activity at concentrations of 12.5 mg / mL for *Acinetobacter* sp. and *S. aureus* and concentrations below 3.0 mg / mL for *Bacillus* used in this study. Thus, it is concluded that *Bacillus safensis*, MF326565, was able to produce biosurfactant from an alternative substrate (molasses from sugarcane) and that it was effective in emulsifying hydrophobic compounds, besides presenting biological activity.

Keywords: Biosurfactant. *Bacillus safensis*. Agroindustrial waste. Stability. Antimicrobial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos surfactantes.....	17
Figura 2. Propriedades físicas dos surfactantes.....	18
Figura 3. Estrutura química dos biossurfactantes.....	21
Figura 4. Glicolipídeos e surfactina	24
Figura 5. Coloração de Gram do <i>Bacillus safensis</i> MF326565.....	29
Figura 6. Aspecto morfológico das colônias do <i>Bacillus safensis</i> MF326565.....	29
Figura 7. Processo de extração e purificação do biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i>	36
Figura 8. Crescimento e consumo de substrato para o experimento em <i>shaker</i> utilizando <i>Bacillus safensis</i>	39
Figura 9. Crescimento e consumo de substrato para o experimento em <i>shaker</i> utilizando <i>Bacillus safensis</i>	40
Figura 10. Índice de emulsificação a partir dos sobrenadantes dos experimentos cultivados em <i>shaker</i>	420
Figura 11. Índice de emulsificação a partir dos sobrenadantes dos experimentos cultivados em <i>shaker</i>	431
Figura 12. Índice de emulsificação a partir dos sobrenadantes dos experimentos cultivados em <i>shaker</i>	442
Figura 13. Produção de espuma a partir do crescimento em <i>shaker</i>	45
Figura 14. Índice de emulsificação ao longo de 35 dias análise, a partir de sobrenadantes cultivados em <i>shaker</i>	46
Figura 15. Índice de emulsificação ao longo de 75 dias em óleo de motor a partir do sobrenadante do cultivo em <i>shaker</i>	48
Figura 16. Avaliação da tensão superficial (mN/m).....	49
Figura 17. Crescimento e consumo de substrato do experimento cultivado em biorreator de bancada	50
Figura 18. Produção de espuma a partir do cultivo em biorreator de bancada	51
Figura 19. Crescimento, consumo de substrato e acúmulo de produto do experimento cultivado em biorreator de bancada	51
Figura 20. Crescimento, consumo de substrato e acúmulo de produto do experimento cultivado em biorreator de bancada	530
Figura 21. Produção e acúmulo de biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> MF326565 a partir de experimento cultivado em biorreator de bancada.....	553
Figura 22. Índice de emulsificação em óleo de motor a partir de sobrenadante de experimento cultivado em biorreator de bancada	56
Figura 23. Microemulsões e índice de emulsificação em querosene a partir do sobrenadante coletado em amostras regulares e espuma coletada em biorreator	58
Figura 24. Índice de emulsificação em querosene e em óleo vegetal a partir da espuma coletada em biorreator	58
Figura 25. Teste de estabilidade do biossurfactante no IE ₂₄ em óleo de motor a partir do biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> MF326565.....	607
Figura 26. Avaliação da estabilidade frente a variação de temperatura (15~100 °C) a partir do Índice de emulsificação (IE ₂₄) em óleo de motor.....	61
Figura 27. Avaliação da estabilidade frente a variação de pH (2,0~12,0) a partir do Índice de emulsificação (IE ₂₄) em óleo de motor.....	62
Figura 28. Avaliação da estabilidade frente a variação de salinidade (2~10 % de NaCl) a partir do índice de emulsificação (IE ₂₄) em óleo de motor	63
Figura 29. Aparência do biossurfactante seco (pó) após extração e purificação.....	64

Figura 30. Espectrograma comparativo (FTIR) do biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> após cultivo em biorreator de bancada..	65
Figura 31. Análise qualitativa do teste de inibição de crescimento por difusão em ágar a partir do biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> MF326565.....	67
Figura 32. Análise quantitativa do teste de inibição de crescimento por difusão em ágar a partir do biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> MF326565.....	69
Figura 33. Análise de microdiluição (CIM) a partir do biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> MF326565.....	71
Figura 34. Análise de microdiluição (pós-teste) para avaliar o efeito bacteriostático ou bactericida promovido pelo biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> M326565.....	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 SURFACTANTES	17
3.2 BIOSSURFACTANTE.....	20
3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	22
3.4 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	25
3.5 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	26
3.6 SISTEMA DE CULTIVO EM BIORREATORES.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Microrganismo	29
4.2 Preparo do inóculo.....	29
4.3 Meio e condições de cultivo para produção de biossurfactantes	30
4.4 Determinação das variáveis do processo	30
4.4.1 Concentração celular	31
4.4.2 Método gravimétrico.....	31
4.4.3 Método espectrofotométrico (absorbância)	31
4.4.4 Consumo do substrato	31
4.4.5 Medida direta e indireta da presença de biossurfactante.....	32
4.4.6 Índice de emulsificação	32
4.4.7 Determinação de tensão superficial.....	33
4.4.8 Teste de espalhamento de gota.....	33
4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos	33
4.6 Determinação-purificação de biossurfactante.....	35
4.6.1 Precipitação ácida	35
4.6.2 Extração líquido-líquido	36
4.7 FTIR – Infravermelho por transformada de Fourier	36
4.8 Atividade antimicrobiana.....	36
4.9 Análise estatística	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Experimentos em <i>shaker</i>	38
5.1.1 Crescimento e consumo do substrato	38
5.1.2 Índice de emulsificação (IE24)	41

5.1.3 Avaliação da tensão superficial (mN/m).....	48
5.2 Experimentos em biorreator.....	49
5.2.1 Crescimento, consumo e produção de biossurfactante.....	49
5.2.2 Parâmetros cinéticos em biorreator	53
5.2.3 Índice de emulsificação (IE24)	55
5.2.3.1 Estabilidade do biossurfactante	58
5.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	63
5.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	65
6 CONCLUSÃO.....	73
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	83
APÊNDICE A – Espectrograma de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de todos os experimentos em biorreator.....	83

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas capazes de interagir com superfícies de diferentes polaridades onde sua estrutura química é constituída por duas porções, sendo uma hidrofóbica e a outra hidrofílica onde a porção apolar é, frequentemente, uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica (EHRHARDT, 2015). Estas moléculas podem reduzir a tensão superficial e interfacial entre ar-líquido, líquido-líquido e sólido-líquido (SELLAMI et al., 2016). Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para um amplo espectro de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (BANAT, 2002).

Os surfactantes sintéticos são em sua maioria derivados de petróleo e apresentam estrutura com baixa degradabilidade e alta toxicidade para o ambiente (REIS et al., 2013). Nesta perspectiva, existem microrganismos como bactérias, fungos e leveduras que podem sintetizar compostos orgânicos que exibem atividade superficial, conhecidos como biosurfactantes, e estes podem ser encontrados na superfície das células microbianas ou excretados extracelularmente (MULLIGAN, 2005). As vantagens relacionadas aos biosurfactante estão associadas à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e possibilidade de produção a partir de recursos renováveis através da fermentação (MARCHANT; BANAT, 2012; REIS et al., 2013). Dentre as características desejáveis dos biosurfactantes destaca-se a biorremediação de ambientes contaminados com compostos hidrofóbicos, aplicabilidade terapêutica (antimicrobiana, antitumoral e antiviral), aplicabilidade na indústria alimentícia, cosmética e na agricultura (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os biosurfactantes apresentam-se bastante promissores para diversas áreas, porém seu uso é limitado devido à falta de processos rentáveis de produção (REIS et al., 2013). Estima-se que a matéria-prima para o processo de produção represente cerca de 30 % do custo e que a recuperação do biosurfactante seja de 60 % (BARROS et al., 2007; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2012). De acordo com o foco de utilização do biosurfactante os custos podem ser diferenciados, uma vez que determinadas aplicações não requerem alto grau de pureza, porém os gastos com substrato ainda são entraves na produção. Diante disto, a produção de biosurfactante a partir de resíduos agroindustriais tornou-se foco principal de muitas pesquisas (GUDIÑA et al., 2015; MARIN et al., 2015).

Os resíduos ricos em carboidratos ou lipídios e com adequada relação carbono/nitrogênio, bem como altas concentrações de micronutrientes são importantes para o metabolismo microbiano e produção de biossurfactantes (BARROS et al., 2008). Há na literatura que o resíduo da indústria de farinha denominado “manipuera” é uma boa alternativa para crescimento e produção de surfactina (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004). O melaço também é um resíduo bastante rico em carboidrato e também de nitrogênio que oferece condições ideais para produção de biossurfactantes (JOSHI et al., 2008; MOUAFO; MBAWALA; NDJOUENKEU, 2018; NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2012).

O desenvolvimento de novas condições de fermentação pode resultar em um aumento da produtividade de biossurfactantes, o que inclui, além de substratos alternativos, equipamentos e métodos de extração. Tais estratégias são fundamentais para otimizar o processo desde a produção até a recuperação dos biossurfactante (DESAI; BANAT, 1997). Sendo assim, a otimização das condições de cultivo consiste em melhorar as combinações dos fatores essenciais ao desenvolvimento do microrganismo, como proporção, tempo de incubação do inóculo, temperatura e agitação (MANO, 2008).

Diante deste exposto, o objetivo deste trabalho foi produzir biossurfactante em biorreator de bancada utilizando *Bacillus safensis*, MF326565, isolado de solo canavieiro e melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo e investigar sua atividade antimicrobiana.

2 OBJETIVO GERAL

- Produzir biossurfactante em biorreator de bancada utilizando *Bacillus safensis* MF326565 isolado de solo canavieiro e melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

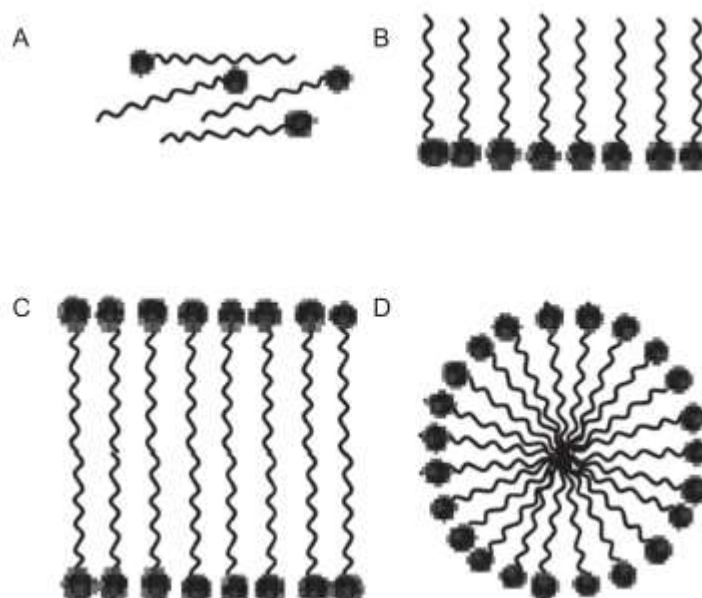
- Analisar a cinética do processo fermentativo em biorreator de bancada utilizando como substrato o melaço de cana de açúcar;
- Verificar a influência do extrato de levedura como fonte de nitrogênio no cultivo em biorreator;
- Caracterizar o biossurfactante produzido quanto a estabilidade em variação de pH, temperatura e força iônica;
- Caracterizar o biossurfactante quanto à redução de tensão superficial e ao índice de emulsificação;
- Purificar o biossurfactante produzido;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do biossurfactante.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfipáticas (anfifílicas), ou seja, capazes de interagir com superfícies de diferentes polaridades, sua estrutura química formada por regiões polares e não polares que proporcionam distintas interações (Fig. 1). A parte não polar, hidrofóbica é geralmente uma cadeia de hidrocarboneto (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). O componente polar aparece em muitas variações (GEORGIU; LIN; SHARMA, 1992).

Figura 1 – Estrutura básica dos surfctantes.



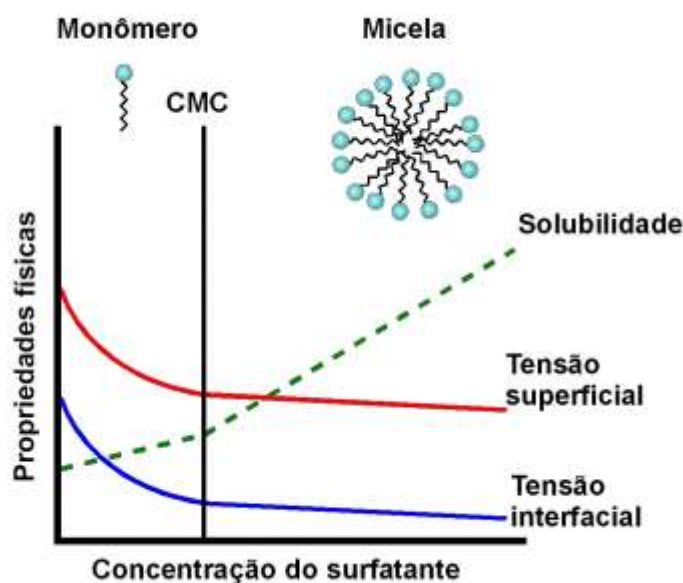
Montagem de monômeros de surfactantes em diferentes estruturas. (A) Monômeros isolados quando a concentração é menor que a CMC. Quando a concentração é acima da CMC, os monômeros podem se agregar em formas de micelas tal como (B) cadeias lineares, (C) bicamadas planas, e (D) estruturas esféricas (SATPUTE et al., 2010).

Surfactantes são geralmente classificados em quatro categorias, de acordo com a carga formal presente na sua cabeça hidrofílica: aniônica (carregada negativamente), catiônica (carregada positivamente), não-iônica (sem carga) e anfotérica (carregadas positivamente e negativamente em pH intermediário) (KUME; GALLOTTI; NUNES, 2008). A região apolar formada por hidrocarbonetos que podem se apresentar de forma linear, ramificada, com ligações simples e/ou duplas além de serem constituídas por anéis aromáticos, possibilitando diferentes tipos de interações com diversas superfícies (BUENO, 2008). Esta característica anfifílica permite que tais substâncias possuam grande ação superficial, ou seja, elas tendem a

se distribuir nas interfaces de duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

As propriedades desejáveis para um bom surfactante incluem a melhoria da solubilidade, redução da tensão superficial e baixa concentração micelar crítica (CMC) (MULLIGAN, 2005). Estas características conferem ao surfactante a propriedade detergente. A CMC é definida como a quantidade mínima de monômeros de surfactantes capazes de reduzir a tensão superficial (MULLIGAN, 2005). A CMC é definida como a mínima concentração necessária para iniciar a formação de micelas (BECHER, 1965). As micelas (Fig. 2) são estruturas termodinamicamente estáveis, não estáticas e que existem dentro de uma dinâmica de equilíbrio, simplesmente como um agregado dinâmico (MANIASSO, 2001; ROSEN, 1978).

Figura 2 – Propriedades físicas dos surfactantes



Tensão superficial, interfacial e solubilidade em função da concentração de surfactante (MULLIGAN, 2005). Adaptado por Cara (2009).

Um bom surfactante é aquele que tem a capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m e a tensão interfacial (tensão entre líquido polar e não polar) como água em *n-hexadecano* de 40 para 1 mN/m (MULLIGAN, 2005). Portanto a efetividade dos tensoativos está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir respectivamente valores menores que 30 e 1 mN/m (GOUVEIA et al., 2003).

Os surfactantes constituem uma importante classe de compostos químicos amplamente utilizados em vários setores da indústria moderna. Durante a década de 80 a procura por surfactantes aumentou aproximadamente 300% dentro da indústria química (GREEK, 1990) e sua produção no ano 2000 excedeu três milhões de toneladas por ano gerando quatro bilhões de dólares (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000b).

Os principais usos desses surfactantes são em aplicações de detergentes industriais e domésticos e em agentes emulsificantes. Eles são empregados em quase todos os tipos de líquidos, pastas e produtos de limpeza em pó, desde produtos industriais pesados até detergentes mais suaves, utilizados em diversos tipos de fábricas (MULLIGAN; EFTEKHARI, 2003).

A indústria do petróleo tem sido tradicionalmente a principal usuária, tal como em aplicações de recuperação aumentada de óleo (EOR). Para Tran (2018), EOR -Enhanced Oil Recovery - é o processo de aumentar a quantidade de óleo que pode ser recuperado de um reservatório, geralmente por meio da injeção de uma substância em um poço existente para aumentar a pressão e reduzir a viscosidade do óleo, nos quais, os surfactantes aumentam a solubilidade dos componentes do petróleo (MULLIGAN, 2005; FALATKO & NOVAK, 1992).

A escolha do surfactante é baseada principalmente no custo do produto, no entanto, o tipo de carga, comportamento físico-químico, solubilidade e comportamento de adsorção são alguns dos mais importantes critérios de seleção para surfactantes. Na década de 90 já se discutia o desenvolvimento de tecnologia para uso na biorremediação de terrenos contaminados, solventes orgânicos, agentes quelantes, ácidos, bases, e, para melhorar remoção de metal (OBERBREMER et al., 1990; SAMSON et al., 1990; HOLDEN et al., 1989).

O uso dos surfactantes cresceu muito no final do século passado e vem crescendo cada vez mais na atualidade, orquestrado pelo consumo excessivo de derivados do petróleo que são a causa dos mais severos danos ambientais. Na década de 90 já se discutia o uso consciente de surfactantes menos agressivos ao ambiente. Os principais fatores que devem ser considerados na seleção de surfactantes incluem eficácia, custo, biodegradabilidade, toxicidade e a capacidade de reciclagem (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001).

Nesta perspectiva o uso de biossurfactantes já despertava bastante interesse do mercado por conta das características ambientalmente desejáveis, minimizando os impactos causados pelos sintéticos derivados do petróleo. Para West & Harwell (1992) os biossurfactantes podem

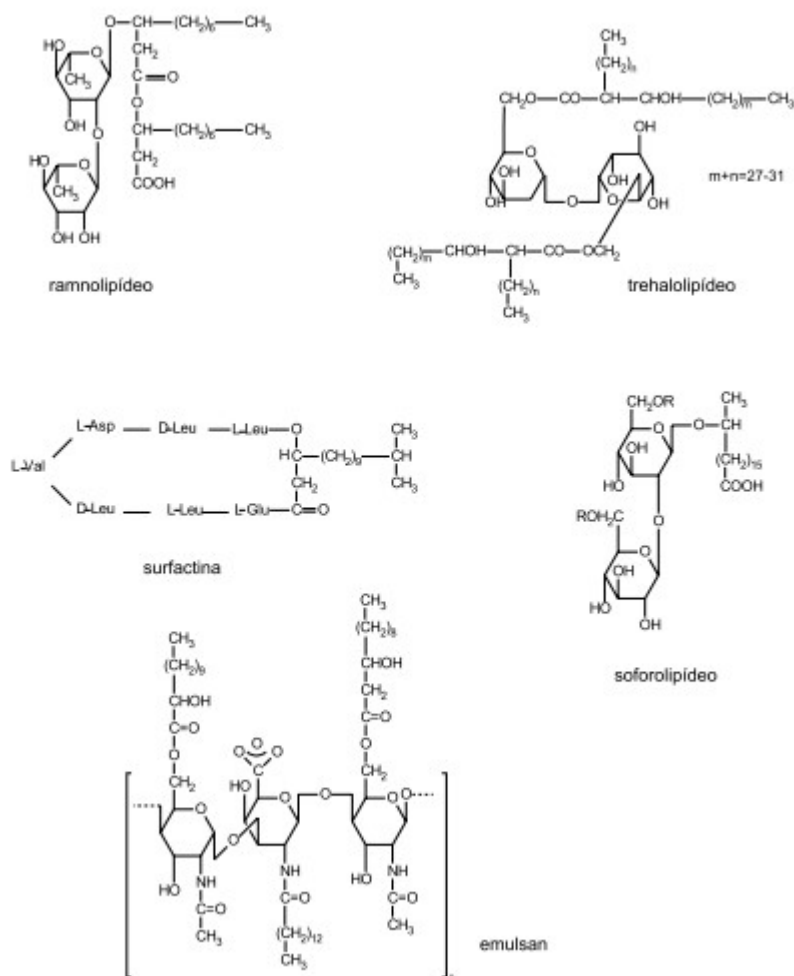
ser mais biodegradáveis, mais tolerantes ao pH, salinidade e variação de temperatura, além de serem em alguns casos menos dispendiosos. Atualmente observa-se que o vasto conhecimento construído acerca dos biossurfactantes possibilitou a redução nos custos de produção, além das tecnologias que envolvem seu uso.

3.2 BIOSSURFACTANTE

Os biossurfactante são moléculas com as mesmas propriedades dos surfactantes sintéticos, porém com sua produção derivada do metabolismo de organismos vivos, sendo estes microrganismos ou organismos superiores. Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante são denominados biossurfactante (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Estruturalmente falando, os biossurfactante apresentam na sua porção hidrofílica um ácido orgânico, cátions peptídicos, ânions, mono-, di- ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica de cadeias de hidrocarbonetos insaturados, saturados ou ácidos graxos (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

Os biossurfactante (Fig. 3) apresentam uma classificação de acordo com o seu peso molecular. São classificados principalmente em duas classes: agentes de superfície de baixo peso molecular chamados biossurfactantes (lipopeptídeo, glicolipídeos) e bioemulsificantes que são agentes de superfície de alto peso molecular conhecidos como bioemulsan (ROSENBERG; RON, 1997; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). De acordo com Rosenberg & Ron (1999) os bioemulsificadores de baixa massa molecular são geralmente glicolípidos, como os trealolipídeos, soforolipídeos, ramnolipídeos, ou lipopeptídeos, como a surfactina, gramicidina S, polimixina e seus correlatos. Os bioemulsificadores de massa molecular elevada são polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Figura 3 – Estrutura química dos biossurfactantes



Alguns tipos de biossurfactante produzidos por microrganismos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Apesar de apresentarem características comercialmente desejáveis e ambientalmente sustentáveis, a produção de biossurfactante em escala comercial é pouco desenvolvida por conta do baixo rendimento e do alto custo. Economicamente falando, a produção gira em torno de três fatores básicos: custos de matéria prima (I), viabilidade econômica de procedimentos e recuperação adequada (II) e o rendimento do produto (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). O mesmo autor ressalta ainda:

Diante das restrições econômicas associadas à produção de biossurfactantes, três estratégias básicas foram adotadas mundialmente para tornar este processo competitivo em termos de custo: (i) o uso de substratos mais baratos e de resíduos para reduzir os custos iniciais de matéria-prima envolvidos no processo; (ii) desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultura e processos de separação de baixo custo para a produção e recuperação máxima de biossurfactante; e (iii) desenvolvimento e uso de estirpes mutantes ou recombinantes

superprodutoras para aumentar o rendimento de biossurfactante (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

Os biossurfactantes ganharam maior atenção ao longo dos anos por apresentarem algumas vantagens em relação aos surfactantes, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e possibilidade de serem produzidos com a utilização de matérias-primas renováveis e de baixo custo (NITSCHKE; PASTORE, 2006). As características desejáveis dos surfactantes microbianos estão relacionadas à sua atividade superficial, tolerância ao pH, temperatura, força iônica, biodegradabilidade, baixa toxicidade, capacidade emulsificante, demulsificante e atividade antimicrobiana (CHAKRABARTI, 2012). Outras vantagens dos biossurfactantes incluem: diversidade estrutural que pode ligar a propriedades únicas a possibilidade de custo-efetivo fazendo do biossurfactante uma escolha promissora para aplicação no meio ambiente (HUA et al., 2003).

3.3 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

A grande diversidade de compostos com ação surfactante produzidas por microrganismos se dá pela característica intrínseca de cada organismo produtor e que estes apresentam especificidades. Desta forma o tipo, quantidade e qualidade do biossurfactante varia de acordo com o microrganismo produtor, com a natureza do substrato disponível, com a concentração de íons como nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio e demais condições de cultura, como pH, temperatura, agitação e oxigenação (BANAT, 1995).

Ao contrário dos surfactantes quimicamente sintetizados, que geralmente são classificados de acordo com a natureza do seu agrupamento polar, os biossurfactantes são geralmente categorizados principalmente pela sua composição química e origem microbiana (KRISHNASWAMY et al., 2008). Rosenberg & Ron (1999) sugerem que os biossurfactantes sejam divididos em de baixa massa molecular que eficientemente reduzem a tensão interfacial e superficial, e polímeros de alta massa molecular que são mais eficazes como agentes estabilizadores de emulsão. Os biossurfactantes, de modo geral, podem ser classificados em: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos/lipídeo neutro, além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (BARROS et al., 2007).

A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra e a porção hidrofóbica é baseada em ácidos graxos de cadeia longa ou derivados de ácidos graxos, enquanto a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um fosfato ou um peptídeo cíclico (KRISHNASWAMY et al., 2008).

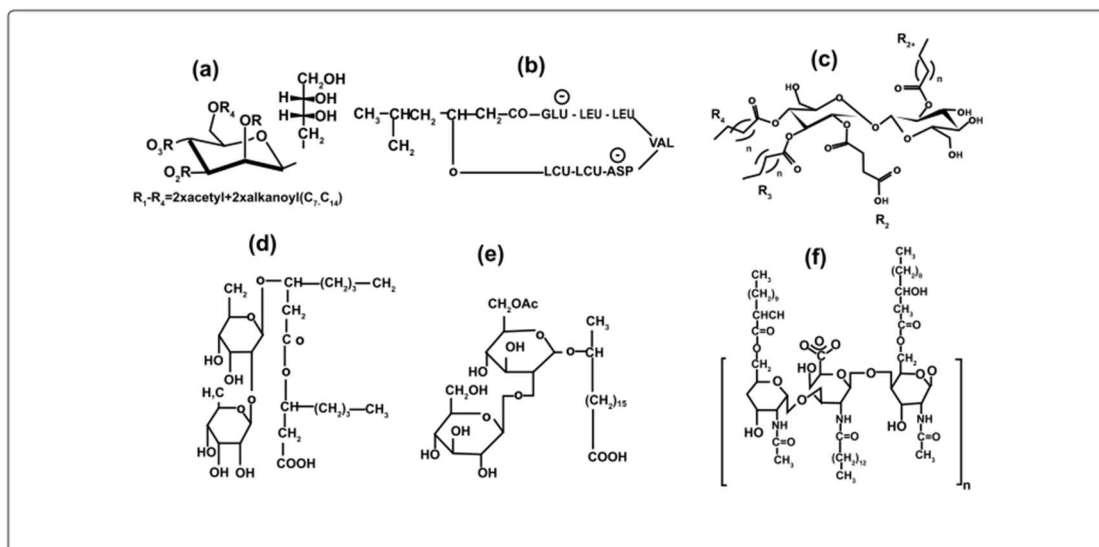
Os glicolipídeos (Fig. 4) são carboidratos em combinação com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxialifáticos (KRISHNASWAMY et al., 2008). Os mais conhecidos são os ramnolipídeos, trealolipídeos e os soforolipídeos (BANAT, 1997).

Os ramnolipídeos são glicolipídios, nos quais uma ou duas moléculas de ramnose estão ligadas a uma ou duas moléculas de ácido hidroxidecanóico. É o biossurfactante amplamente estudado e o glicolipídio produzido por *P. aeruginosa* (EDWARDS & HAYASHI, 1965).

O trealolipídeo é um dissacarídeo (treiose) ligado ao ácido micólico (típico de parede de *Mycobacterium*), encontrado como subproduto de *Nocardia* e *Corynebacterium* (KRISHNASWAMY et al., 2008). Trealolipídeos de *Rhodococcus erythropolis* e *Arthrobacter* spp. baixaram a tensão superficial e interfacial no caldo de cultura de 25-40 e 1-5 mN/m, respectivamente (ASSELINEAU; ASSELINEAU, 1978). Trealolipídeos diferem no tamanho e estrutura do ácido micólico, no número de átomos de carbono e no grau de insaturação nos diferentes microrganismos produtores deste biossurfactante (ASSELINEAU; ASSELINEAU, 1978).

Os soforolipídeos são glicolipídios produzidos por leveduras e consistem de um carboidrato dimérico de soforose ligado a um ácido graxo de cadeia longa de hidroxila por ligação glicosídica (VIJAYAKUMA; SARAVANAN, 2015). Soforolipídeos são geralmente uma mistura de pelo menos seis a nove soforolipídeos hidrofóbicos diferentes e a sua forma lactônica é a mais preferível em várias aplicações (GAUTAM; TYAGI, 2006; HU; JU, 2001). Estes glicolipídeos são geralmente produzidos pela levedura *Torulopsis bombicola* (COOPER; PADDOCK, 1984).

Figura 4 – Glicolídeos e Surfactina



Estrutura química de alguns biossurfactantes glicolipídicos: manosileritritol lipídeo (a), surfactina (b), trealolipídeo (c), soforolipídeo (d), ramnolipídeo (e) e emulsan (f) (REIS et al., 2013)

Os lipopeptídeos são lipídeos ligados a uma cadeia polipeptídica (ROSENBERG; RON, 1999). O gênero *Bacillus* sp. pode produzir surfactantes lipoprotéicos como iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina, bacilomicina e surfactina, os quais possuem atividades antibióticas (BARROS et al., 2007). É um grupo de biossurfactante muito promissor quanto a atividade antimicrobiana pois há relato na literatura que são eficazes contra várias bactérias, algas, fungos e vírus (VIJAYAKUMA; SARAVANAN, 2015). O autor ainda ressalta que a iturina de *B. subtilis* foi encontrada ativa mesmo após a autoclavagem, pH 5-11 e com uma vida útil de 6 meses a -18°C . Besson et al. (1976) relataram a propriedade antifúngica e Singh e Cameotra (2004) relataram a propriedade antibacteriana do lipopeptídeo iturina produzida por *Bacillus subtilis*. Há na literatura relatos da produção de lipopeptídeo decapeptídico com ação antibiótica (gramicidina) produzida por *B. brevis* e polimixina que também é um antibiótico produzido por *B. polymyxa*. (MARAHIEL et al., 1979; SUZUKI et al., 1965).

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico produzido por *Bacillus subtilis* que é um dos biossurfactantes mais importantes, este é composto de uma estrutura de anel com sete aminoácidos acoplados a uma cadeia de ácido graxo via ligação lactônica (Fig. 5-b). Tem a capacidade de diminuir a tensão superficial de 72 para 27,9 mN/m em concentrações tão baixas quanto 0,005% (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968).

A liquenisina é um lipopeptídeo produzido por *Bacillus licheniformis* que tem similaridade estrutural e propriedades físico-químicas bem próximas da surfactina (MCINERNEY; JAVAHERI; NAGLE, 1990). O *B. licheniformis* produz outros lipopeptídeos

que agem sinergicamente e exibem excelente estabilidade a variação de temperatura, pH e salinidade (KRISHNASWAMY et al., 2008).

A iturina é um dos lipopeptídeos de menor massa molecular, sua estrutura consiste em duas partes: uma região peptídica composta por resíduos de 7 aminoácidos e uma cauda hidrofóbica contendo 11-12 átomos de carbono, indicando claramente sua característica anfifílica. É uma molécula de grande interesse por conta da sua atividade biológica e propriedade físico-química (MEENA; KANWAR, 2015).

A fengicina é um lipopeptídeo bioativo produzido por várias espécies de *Bacillus subtilis* que tem atividade antifúngica contra fungos filamentosos. Este representa a terceira família de lipopeptídeo depois da surfactina e da iturina (MEENA; KANWAR, 2015). Esta molécula bioativa é um lipodecapeptídeo contendo um anel lactônico em um ácido graxo que pode ser saturado ou insaturado (AKPA et al., 2001). A porção peptídica da fengicina consiste de uma cadeia decapeptídica, dos quais 8 aminoácidos (Tyr, Thr, Glu, Ala, Pro, Gln, Tyr e Ile) estão envolvidos na formação de um anel peptídico via ligação lactônica entre o lado OH da cadeia fenólica da Tyr3 e C-terminal-COOH da Ile10 (PATHAK et al., 2012).

As bactérias e leveduras podem produzir grandes quantidades de ácidos graxos e surfactantes fosfolipídicos durante o crescimento em n-alcenos, além de liberar partículas extracelulares de suas membranas para formar microemulsão que desempenham papel fundamental na absorção de alcanos pelas células microbianas, tal comportamento é muito comum em *Acinetobacter* sp. (VIJAYAKUMA; SARAVANAN, 2015).

Os biossurfactante poliméricos são conhecidos como emulsan, liposan, alasan, lipomanan são constituídos por um aglomerado complexo de polissacarídeo-proteína. Emulsan é um agente emulsificante eficaz para hidrocarbonetos em água, mesmo em uma concentração tão baixa quanto 0,001-0,01% (CHAKRABARTY, 2012). O liposano é um emulsificante extracelular solúvel em água sintetizado por *Candida lipolytica* e é composto de 83% de carboidratos e 17% de proteína (COOPER; PADDOCK, 1984).

3.4 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera onde são utilizados na recuperação de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (VAN DYKE; LEE; TREVORS, 1991). Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Atualmente, as

aplicações dos biossurfactantes vão além da questão petrolífera de recuperação de hidrocarbonetos.

Todos os principais compostos microbianos com ação superficial têm sido propostos para uma aplicação MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery)(BANAT et al., 2010). Embora os ramnolipídios tenham sido usados com mais frequência, os lipopeptídeos, como a surfactina, a liquenisina e o emulsan, também se mostraram muito eficazes no aprimoramento da recuperação de óleo (SEN, 2008).

Na agricultura os biossurfactantes aumentam a qualidade do solo, ajudam na eliminação de patógenos, fornecem mecanismos para interação planta/microrganismos, facilitam a dispersão de compostos fungicidas, pesticidas e herbicidas e ajudam na biorremediação do solo como um todo na eliminação de compostos nocivos (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

Na indústria alimentícia os biossurfactantes têm sido utilizados em várias aplicações de processamento de alimentos, mas eles geralmente desempenham um papel de ingrediente na formulação e na formação e estabilização de emulsão devido à sua capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial (REIS et al., 2013). Também é usado para controlar a aglomeração de glóbulos de gordura, estabilizar sistemas aerados, melhorar a textura e a consistência de produtos à base de gordura (KRISHNASWAMY et al., 2008).

Os biossurfactante também apresentam atividade terapêutica no combate a microrganismos que causam graves doenças, atuando como agentes antiadesivos, anticancerígenos, imuno modulatório e antiviral (KRISHNASWAMY et al., 2008). A surfactina neste particular apresenta-se como alvo nos estudos por conta da versatilidade do seu uso. A cadeia de carbono da surfactina atua na inativação dos envelopes virais, especialmente o vírus da herpes e os retrovírus (SEYDLOVÁ, 2011; SINGLA; DUBEY; DUBEY, 2014). A surfactina apresenta efeito antiparasitário, larvicida, anticancerígeno, antiviral, trombolítico, antifúngico e antimicrobiano (MEENA; KANWAR, 2015).

3.5 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Embora os biossurfactantes possuam claras vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, associadas à equivalente atividade como agentes de superfície e emulsificantes, a produção de surfactantes biológicos em escala industrial ainda não é realizada devido aos altos custos e baixos rendimentos (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

Para superar os dispendiosos custos associados à produção de biossurfactantes, duas estratégias básicas para tornar a produção rentável são geralmente adotadas: o uso de substratos de baixo custo e o desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultura, processos de recuperação de baixo custo e máxima recuperação de biossurfactante (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2012).

As condições de cultivo são importantíssimas no processo de produção de biossurfactante, uma vez que a demanda energética e nutricional dos microrganismos é bem distinta e os fatores ambientais desempenham papel fundamental para um bom rendimento. A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, variações no pH, temperatura, velocidade de aeração e agitação ou quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como uma baixa concentração de nitrogênio (DESAI; BANAT, 1997).

Dentre os fatores que afetam a produção de biossurfactante destaca-se a fonte de carbono como principal entrave, visto que os custos podem chegar a 30 % do processo total. A qualidade e a quantidade da produção de biossurfactante são influenciadas pela natureza da fonte de carbono (HATHA; EDWARD; PATTANATHU RAHMAN, 2007).

Para o cultivo alternativo, diversos autores relatam a formação de várias biomoléculas surfactantes a partir de melaço de cana de açúcar. Outra abordagem consiste em utilizar matérias-primas renováveis de baixo custo a partir de várias fontes, incluindo resíduos industriais de óleos de fritura, resíduos de refinarias de petróleo, melaços, resíduos ricos em amido, águas residuais de mandioca e bagaços de uvas destilados (NITSCHKE; RIVERA et al.; SOBRINHO et al., 2006, 2007, 2008).

O melaço, utilizado como fonte de carbono, apresenta condições ideais para o cultivo pois detém de nutrientes essenciais ao desenvolvimento e produção de surfactantes pelos microrganismos. Em 75 % de peso seco, cerca de 60 % corresponde a açúcar, proteína (2,5 %), além de sais de potássio, cálcio, magnésio, fósforo e vitaminas, comuns ao micro e macronutrientes encontrados em diversos meios bacterianos (SAHARAN, SAHU, SHARMA, 2011).

A fonte de nitrogênio é muito importante no cultivo de microrganismos por conta de todo o metabolismo envolvido na síntese de proteínas que desempenham papel fundamental no

desenvolvimento celular. Dentre as diversas fontes de nitrogênio existentes (orgânica e inorgânica), o extrato de levedura é o mais utilizado, porém sua concentração depende do microrganismo e do meio de cultura (REIS et al., 2013). Sais de amônio e ureia são fontes de nitrogênio preferidas para a produção de biossurfactante por *Arthrobacter paraffineus*, enquanto o nitrato promove a produção máxima de surfactante em *P. aeruginosa* (DUVNJAK et al.; RAMANA & KARANTH; 1983, 1989).

3.6 SISTEMA DE CULTIVO EM BIORREATORES

Os biorreatores são equipamentos que permitem uma maior produção de bioprodutos, por conta das condições de cultivo que podem ser automatizadas. Há diversos tipos de reatores para diversos tipos de finalidades. Para a produção de biotensioativos, visando um processo em larga escala, ultimamente vem sendo cultivados em biorreatores que operam em sistema de batelada convencional, batelada alimentada, semicontínuo e com recirculação de células (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998). Em processos fermentativos de fermentação descontínua nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos (na forma de ar), antiespumante, e ácido ou base para controle do pH (CRUEGER & CRUEGER, 1984).

O cultivo por batelada e batelada alimentada são modos de condução de bioprocessos, cujas características tornam suas aplicações atrativas para uma grande gama de processos fermentativos, por exigir menos em termos de equipamentos e manutenção (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). São também mais seguros em relação às condições de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator é esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo com todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença única do microrganismo responsável pelo processo (HISS, 2001).

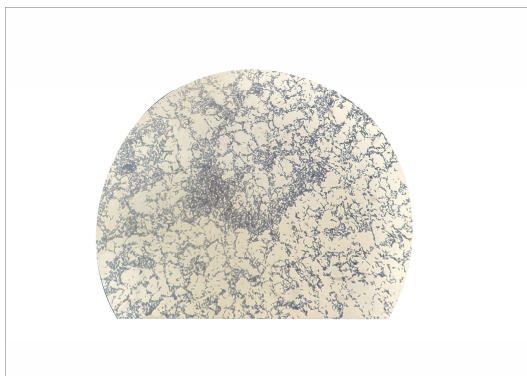
4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp-CBiotec) do Centro de Biotecnologia e também no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia (LBCM-CBiotec), ambos na Universidade Federal da Paraíba - UFPB.

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nesta pesquisa foi o *Bacillus safensis* MF326565, isolado de solo canavieiro e pertencente ao banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM/CBiotec). Este foi selecionado como produtor de biossurfactante pela equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp/CBiotec). As colônias foram repicadas periodicamente em meio de manutenção ágar-LB (Lúria-Bertani), crescidas a 37 °C e mantida em tubo de ensaio com meio LB (Luria Bertani) e mantidas a 4 °C (Figuras 5 e 6).

Figura 5 – Coloração de Gram do *Bacillus safensis* MF326565



Bacillus safensis MF326565 isolada de solo canavieiro e que faz parte do banco de microrganismos do laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM/CBIOTEC) e que foi utilizada nesta pesquisa.

Figura 6 – Aspecto morfológico das colônias do *Bacillus safensis* MF326565



Bacillus safensis MF326565 isolada de solo canavieiro e que faz parte do banco de microrganismos do laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM/CBIOTEC) e que foi utilizada nesta pesquisa.

4.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado através da transferência com alça de platina calibrada (3 alçadas) de colônias de *Bacillus safensis* MF3265656 do meio de manutenção para o frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo utilizado para produção de biossurfactantes. Após transferência, os frascos foram incubados a 37 °C sob agitação de 200

rpm em *shaker* orbital refrigerado (modelo Solab 223). O crescimento do microrganismo foi acompanhado pela determinação da absorbância para processos fermentativos a 600 nm até que a densidade ótica atingisse valores entre 0,6 e 0,8, ideal para inoculação nos experimentos (DAS; MUKHERJEE, 2007).

4.3 Meio e condições de cultivo para produção de biossurfactantes

O melaço da cana de açúcar, resíduo da indústria sucroalcooleira cedido pela ASPLAN/PB (Associação dos Plantadores de Cana), foi utilizado como substrato alternativo para produção de biossurfactantes.

Cultivos em *shaker* orbital refrigerado foram realizados preliminarmente para o diagnóstico dos parâmetros cinéticos, uma vez que não se conhecia o comportamento do microrganismo utilizado no meio proposto e nas condições de processo.

Para os cultivos em *shaker* (Solab 223), 200 rpm e 37 °C, foram realizados experimentos utilizando inicialmente 1,0 % (p/v) de melaço de cana-de-açúcar como substrato e 1 % (p/v) de extrato de levedura como fonte adicional de nitrogênio. A razão de aeração nesses experimentos foi de 0,4, e concentração do inóculo (padronizado) a 10 % (v/v) do volume do meio de cultivo em cada frasco. Amostras coletadas em tempos regulares, nas primeiras 12 h foram retiradas amostras de 4 em 4 h e, nas horas seguintes foram retiradas em intervalos de 12 h para acompanhamento cinético durante 72 h de cultivo.

Para o cultivo em biorreator de bancada (Tecnal - BioTec - vaso de 4,5L), utilizou-se a concentração de substrato de 1 % (p/v) de melaço e 1 % (p/v) de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. O volume de trabalho empregado foi de 2,0, com pH ajustado a 6,8 e esterilizados a 121 °C por 30 min. Os experimentos em biorreator foram mantidos sob agitação controlada 180 rpm e temperatura de 37 °C, com volume de ar de 2 L/min e pH controlados por soluções de ácido cítrico e hidróxido de sódio (1 M). Amostras foram retiradas em tempos regulares, nas primeiras 12 h, as amostras foram coletadas de 3 em 3 h, e nas horas seguintes amostras eram retiradas a cada 6 h para o acompanhamento cinético ao longo de 72 h do processo. A espuma obtida no experimento foi coletada a partir de frasco acoplado ao condensador.

4.4 Determinação das variáveis do processo

4.4.1 Concentração celular

A biomassa foi determinada pelo método gravimétrico (peso seco) e estimado pelo método espectrofotométrico (absorbância) a 600 nm.

4.4.2 Método gravimétrico

Os microtubos (Eppendorf) utilizados durante o cultivo foram previamente secos e levados ao dessecador por 30 minutos antes de aferir sua massa. Ao microtubo com massa conhecida adicionou-se 2mL do caldo fermentado (shaker ou biorreator), centrifugado (MiniSpin – Eppendorf) 10.000 rpm por 10 minutos. Descartado o sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes (2 mL de solução salina 1%, ressuspendidas e centrifugadas novamente por 10 minutos) e levadas à estufa por 24 horas a 85 °C. Transcorrido o tempo, os microtubos foram levados ao dessecador por 30 minutos e depois registrados sua massa em triplicata. O cálculo da determinação de biomassa por peso seco segue a equação (1):

$$\text{Peso seco} = \frac{(\text{Massa microtubo} + \text{células-secas}) - \text{Massa microtubo sem umidade}}{\text{volume da amostra (mL)}} \times 100 \quad (1)$$

4.4.3 Método espectrofotométrico (absorbância)

Uma alíquota do cultivo (2 mL) foi centrifugada, células lavadas e ressuspendidas em solução salina (1% p/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 600 nm e utilizando a solução salina como branco (DAS; MUKHERJEE, 2007). Diluições foram realizadas quando absorbância ultrapassava o limite de detecção do equipamento ($\text{abs} > 0,8$) e contabilizadas na determinação da concentração celular.

4.4.4 Consumo do substrato

Para a determinação da quantidade de substrato utilizou-se o método de DNS proposto por Miller (1959), em que o sobrenadante livre de células (centrifugadas por 5000 rpm por 10 minutos) foi utilizado para quantificação do substrato. O método DNS baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitro-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento da coloração avermelhada, lida espectrofotometricamente em 540 nm (ZANIN et al., 1998).

Como a fonte de carbono utilizada foi o melaço de cana-de-açúcar, portanto rico em sacarose, então foi necessária a hidrólise ácida dessa molécula em açúcares menores, no caso, a glicose e frutose. Em balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 1 mL da amostra (sobrenadante livre de células) e 0,5 mL de HCl (P.A.). A mistura foi aquecida em banho termostatzado a 70 °C por 10 minutos, resfriada com água corrente e neutralizada com NaOH 4 M. Em seguida completou-se o volume do balão volumétrico com água destilada.

Após a hidrólise, 0,5 mL da mistura hidrolisada e 0,5 mL do reagente DNS foram adicionados em tubo de vidro, homogeneizado em *vórtex* e levados ao banho termostatzado a 100 °C por 15 minutos. A amostra resfriada em banho de gelo até a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 4 mL de água destilada e seguida homogeneizada em *Vórtex*. As amostras tiveram suas absorbâncias registradas a 540 nm, utilizando o espectrofotômetro (modelo IL0082-Y-BI), onde o branco da análise foi utilizado 0,5 mL de água destilada + 0,5 mL de DNS. As análises foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão de açúcares glicose (1 g/L) foi realizada previamente para utilização do método DNS. Os valores obtidos multiplicados pelo fator de diluição.

4.4.5 Medida direta e indireta da presença de biossurfactante

O método indireto da presença de biossurfactante produzido no cultivo foi avaliado a partir do índice de emulsificação avaliado após 24 horas após homogeneização em *vórtex* (IE₂₄), tensão superficial (TS) e pelo método do espalhamento de gota.

4.4.6 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação (IE) foi determinado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio, foram distribuídos 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, óleo de soja e óleo de motor) e em seguida adicionados 4 mL dos sobrenadantes do cultivo (Erlenmeyer e biorreator). Cada tubo homogeneizado em *vórtex* por 2 min e deixado em repouso por 24 horas. A percentagem de emulsificação foi determinada a partir da Equação (2).

$$IE = \frac{\text{Altura da camada emulsificada (cm)}}{\text{Altura total do líquido (cm)}} \times 100 \quad (2)$$

4.4.7 Determinação de tensão superficial

A medida da tensão superficial (TS) foi feita a partir dos sobrenadantes do cultivo pelo método da dispersão de gotas através do tensiometro Sensadyne QC6000. As condições de análise foram padronizadas para todos os ensaios com o volume médio da amostra de 20 mL a temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado (25 °C) no início das análises medindo-se a TS da água destilada (padrão) cujo valor é 72 mN/m. Os cálculos para a redução da TS foram realizados considerando a TS inicial do meio de cultivo isento de células.

4.4.8 Teste de espalhamento de gota

O teste qualitativo do espalhamento da gota, para detecção inicial da produção de biossurfactante pelo processo proposto foi realizado em placa de Petri untada com 2 mL de óleo vegetal, onde uma alíquota de 5 mL do sobrenadante do cultivo (espuma) foi colocado em cada placa e o espalhamento da gota de óleo avaliado após 2 minutos (MORIKAWA; HIRATA; IMANAKA, 2000).

4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Segundo Hiss (2001), para se determinar a cinética de um processo fermentativo em batelada é importante analisar o comportamento dos componentes em relação ao tempo de fermentação. Estes podem ser substrato, biomassa, produto e as condições físicas do processo. Com estes dados em função do tempo é possível ajustar curvas a partir das quais são obtidos os parâmetros de transformação: velocidades específicas (μ_x , μ_s , μ_p) e fatores de conversão ($Y_{X/S}$, $Y_{X/P}$ e $Y_{P/S}$) (ANDRADE, 2012).

A produtividade volumétrica de biomassa (P_x) foi calculada a partir da equação 3 (HISS, 2001):

$$P_x = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{t_f} \quad (3)$$

Onde: P_x = produtividade volumétrica de biomassa [$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$], $X_{\text{máx}}$ = concentração máxima de células [g.L^{-1}], X_0 = concentração inicial de células [g.L^{-1}] e o t_f = tempo de fermentação [h].

A produtividade em produto (P_P) representa a velocidade média de formação de produto em relação ao tempo de cultivo, calculada pela equação 4 (HISS, 2001):

$$P_P = \frac{P_t - P_0}{t_f} \quad (4)$$

Onde: P_P = produtividade em produto [$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$], P_t = concentração volumétrica de produto no tempo de cultivo [g.L^{-1}], P_0 = concentração volumétrica de produto no início do cultivo [g.L^{-1}] e t_f = tempo de cultivo [h].

CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS

As velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de formação de produto (μ_P) foram determinadas conforme equações 8, 9, 10 (HISS, 2001).

$$\mu_X = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (8)$$

$$\mu_S = \frac{1}{x} \left(-\frac{ds}{dt} \right) \quad (9)$$

$$\mu_P = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} \quad (10)$$

DETERMINAÇÃO DA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO CELULAR

A velocidade máxima de crescimento celular do microrganismo ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinada através dos dados obtidos durante o processo e linearizados por curva de concentração celular em função do tempo (HISS, 2001).

FATORES DE CONVERSÃO

O fator de conversão de substrato em células permite conhecer a dinâmica do processo no que diz respeito a capacidade de utilização do substrato para o crescimento celular e que foi calculado a partir da equação 11 (HISS, 2001):

$$Y_{x/s} = \frac{x - x_0}{s_0 - s} \quad (11)$$

Onde: $Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em células, X = concentração final de células, X_0 = concentração inicial de células, S_0 = concentração inicial de substrato, S = concentração final de substrato.

O fator de conversão de substrato em produto permite avaliar a quantidade de produto formada (g/L) em relação à quantidade de substrato consumido no processo, de acordo com a equação 12 (HISS, 2001).

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (12)$$

Onde: $Y_{P/S}$ = fator de conversão e substrato em produto (g/L de produto por g/L de substrato consumido), P = concentração do produto (g/L) no tempo t de cultivo, P_0 = concentração do produto no início de cultivo, S_0 = concentração do substrato no início do cultivo e S = concentração do substrato (g/L) no t de cultivo.

O fator de conversão de células em produto relaciona a formação do produto com o crescimento celular, calculado através da equação 13 (HISS, 2001).

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (13)$$

Onde: $Y_{P/X}$ = fator de conversão e células em produto (g/L de massa seca por g/L de produto), P = concentração do produto (g/L) no tempo t de cultivo, P_0 = concentração do produto no início de cultivo, X = concentração do substrato (g/L) no t de cultivo e X_0 = concentração de massa seca (g/L) no início do cultivo.

4.6 Determinação-purificação de biosurfactante

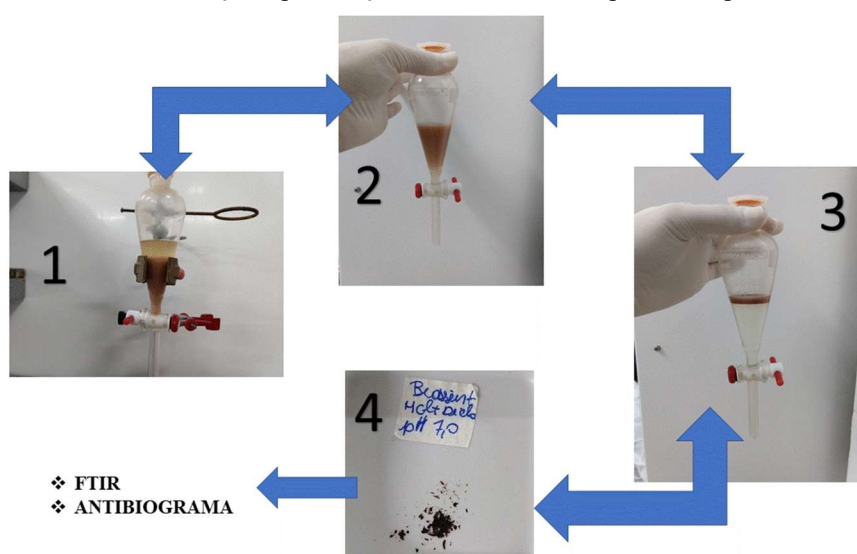
4.6.1 Precipitação ácida

Uma alíquota de 50 mL do sobrenadante isento de célula (espuma) e 10 mL das amostras de tempos regulares (em biorreator) foram submetidos a acidificação (pH 2,0) com ácido clorídrico (P.A.) em tubos tipo Fálcon (50 e 15 mL) e deixados sob refrigeração (4 °C) por 24 h. Após isso, os tubos foram centrifugados por 5000 rpm por 15 minutos e o precipitado foi dissolvido em água deionizada (pH 8,0) e, em seguida, o pH da solução ajustado para 7,0 com auxílio de NaOH 1,0 M (COOPER et al., 1981). Após o processo de precipitação realizou-se extração líquido-líquido com diclorometano (v:v).

4.6.2 Extração líquido-líquido

Foi realizada a extração com uso de diclorometano (v:v) em funil de separação, agitado por inversão durante 5 minutos e seguido por 1 h de repouso. A fase densa foi coletada em um béquer. O processo foi realizado 3 vezes para garantir a extração eficiente do biossurfactante. A fase densa armazenada em béquer (após evaporação do solvente) foi ressuspensa em 2 ml de metanol e mantidas em estufa de secagem até total evaporação do solvente (Fig. 7).

Figura 7 – Processo de extração e purificação do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis*



Crescimento a partir de melaço de cana de açúcar e extrato de levedura (1 % - p/v) como fonte de carbono e nitrogênio. Extração realizada com em todos os experimentos em biorreator.

4.7 FTIR – Infravermelho por transformada de Fourier

As análises de infravermelho foram realizadas misturando 10 mg do biossurfactante purificado e seco com 100 mg de KBr. Foi aplicada uma força de 134 mPa por 2-3 minutos para obter uma pastilha transparente. Os espectros de infravermelho foram registrados em um espectrograma na faixa entre 400 e 4000 cm^{-1} e 32 *scans* usando o espectrômetro de infravermelho marca WQF-510A.

4.8 Atividade antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana promovida pelo biossurfactante produzido do processo fermentativo em biorreator, previamente purificado e seco foram realizadas conforme Bauer et al. (1966), Hanano et al. (2017). Utilizou-se 20 mg do produto solubilizado em 400 μ L de água destilada autoclavada e esta solução foi adicionada a discos de papel com diâmetro de 0,6 cm, nas seguintes concentrações 50; 37,5; 25 e 12,5 μ g/disco, além do controle negativo (discos com água destilada) e o controle positivo com canamicina (30 μ g/disco) (COOKSEY; BbANNISTER; FARRAR, 1975; KARIKALAN; MOHANKUMAR, 2016).

Culturas puras de *Bacillus cereus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* pertencentes ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular (LBCM/UFPB) foram cultivadas em meio ágar-LB por 24 h foram utilizadas. Colônias isoladas foram ressuspensas em solução salina (1 % p/v NaCl), padronizadas ($\text{O.D. } 600 \text{ nm} \leq 0,1$) e uma alíquota de 100 μ L foi inoculada em placa contendo meio Mueller Hinton e espalhadas com auxílio de alça em “T”. Após a adição dos discos contendo biossurfactante e antibiótico, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 h.

As análises para avaliar a atividade antimicrobiana também foram realizadas por meio do método de microdiluição em microplacas de 96 poços de uma solução de 50 mg/mL de biossurfactante e meio Mueller Hinton (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010; HANANO; SHABAN; ALMOUSALLY, 2017). Cada poço recebeu 125 μ L de meio e em sequência, 125 μ L do biossurfactante (50 mg/mL) foi adicionado na primeira coluna da microplaca, resultando numa concentração de 25 mg/mL; serialmente, 125 μ L foi transferido a cada coluna até a décima coluna, resultando numa concentração de 0,048 mg/mL, o volume final de cada poço foi de 125 μ L e a décima coluna ficou com 250 μ L, usada como controle negativo acrescido do biossurfactante. As duas últimas colunas foram reservadas ao controle positivo e negativo respectivamente. Poços foram reservados para receber as diferentes concentrações do biossurfactante, e em duplicata, a fim de ser utilizada como branco, pois o biossurfactante apresenta cor diferente do meio Mueller-Hinton. Todos os poços, exceto os das colunas 10, 11 e 12 foram inoculadas em duplicata com 12,5 μ L de um pré-cultivo em meio Mueller Hinton e padronizadas para absorbância de 0,1. As microplacas foram mantidas a 37 °C por 24 h e depois da incubação a densidade ótica em 620 nm foi determinada para cada poço.

A porcentagem de crescimento dos microrganismos na presença de diferentes concentrações do biossurfactante foi determinada pela seguinte equação (6):

$$\% \text{Crescimento} = \left(\frac{\text{ODc}}{\text{OD0}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Em que: ODc representa a densidade ótica dos poços com diferentes concentrações do biossurfactante e OD0 os poços sem o biossurfactante (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010). Ensaios realizados em duplicata para cada microrganismo.

Para avaliar se o biossurfactante apresentou um efeito bacteriostático ou bactericida após os resultados do CIM (Concentração Inibitória Mínima) no teste de microdiluição com inibição $\geq 90 \%$, alíquotas dos poços foram reinoculados em meio Mueller-Hinton e avaliados após 24 h de incubação a 37 °C. (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008).

4.9 Análise estatística

As análises dos experimentos foram realizadas através do uso do software GraphPad Prism 8, as análises de variância ANOVA foram realizadas e as médias comparadas pelo teste de Bonferroni com nível de significância $P < 0,05(*)$, $P < 0,01(**)$, $P < 0,001(***)$, $P < 0,00001(****)$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimentos em *shaker*

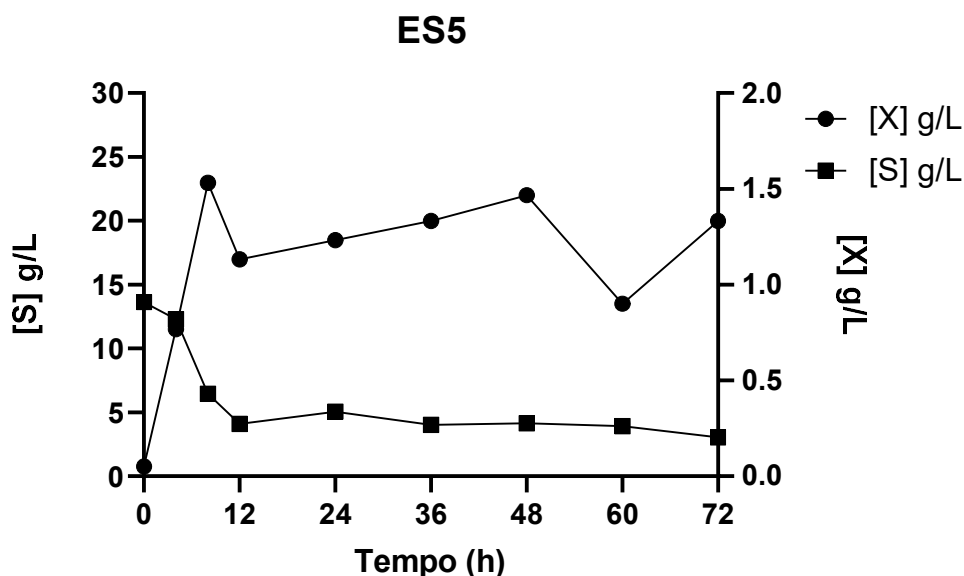
5.1.1 Crescimento e consumo do substrato

Os resultados preliminares do processo em incubadora orbital nas condições pré-estabelecidas para um diagnóstico de crescimento e produção de biossurfactante foi bastante satisfatório, uma vez que foi possível obter uma boa cinética de crescimento mensurado pela absorbância e também da concentração celular a partir do peso seco, levando em consideração o cultivo com extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

A Figura 8 mostra a curva de crescimento bacteriano (ensaio realizado em *shaker* – ES5) apresentado pelo isolado de *Bacillus safensis* MF326565 cultivado com melaço (1 % p/v) como substrato e o extrato de levedura (1 % p/v) como fonte de nitrogênio. Observa-se um crescimento bastante expressivo durante as 10 primeiras horas de cultivo, marcado pela fase

exponencial em que os microrganismos apresentam uma alta atividade metabólica. O crescimento atingiu valores numéricos em torno de 1,6 g/L em termos de concentração celular [X], seguido por uma leve queda e depois uma fase estacionária marcada pelo baixo crescimento. Este comportamento que é típico de cultivo microbiano denota a chegada na fase estacionária de crescimento onde há uma redução de atividade metabólica, bem como a taxa de divisão celular bastante afetada.

Figura 8 - Crescimento e consumo de substrato para o experimento em *shaker* utilizando *Bacillus safensis*



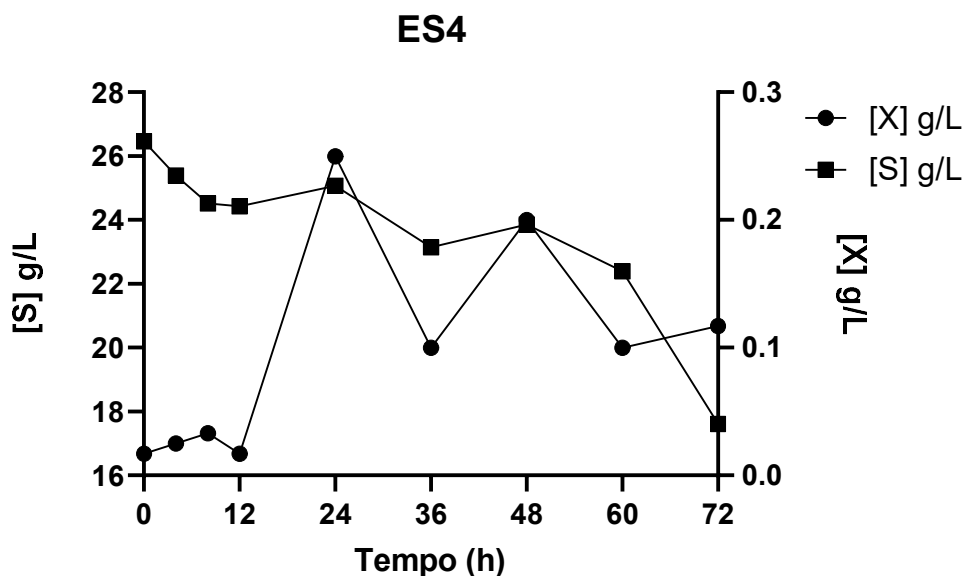
Desempenho do *Bacillus safensis*, MF326565, para o parâmetro crescimento celular [X] e consumo de substrato [S] ao longo de 72 h de cultivo a partir de melaço de cana-de-açúcar e na dependência de nitrogênio 1 % (p/v) (Extrato de levedura). N=3 (média), 200 rpm, 37 °C e razão de aeração 0,4.

Ao observar o consumo do substrato observa-se um decréscimo na concentração de açúcares presentes no sobrenadante ao longo das 72 h do processo, demonstrando sua capacidade metabolizar o substrato (Fig. 8). Esta figura apresenta a relação entre o consumo do substrato e a concentração celular, ambos em g/L, curva característica de processos microbianos. Observa-se, ainda, que ao longo das 72 h houve uma redução na disponibilidade de substrato, em que inicialmente era de 14 g/L e no final do processo apresentava cerca de 4 g/L, sendo assim, o microrganismo utilizou cerca de 10 g/L para promover seu crescimento ao longo do processo de produção de biossurfactante.

Destaca-se que a máxima concentração de células converge com o maior consumo de substrato observado nas primeiras 12 h de cultivo, caracterizando a fase exponencial de crescimento celular. A análise dos parâmetros para este experimento permite destacar a

velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) em 8 h de 0,185 g/L e que o fator de conversão de substrato em célula na fase exponencial de crescimento ($Y_{X/S}$) de 0,207 g/g.

Figura 9 – Crescimento e consumo de substrato para o experimento em *shaker* utilizando *Bacillus safensis*



Desempenho do *Bacillus safensis* isolado MF326565 para a concentração celular [X] e o consumo de substrato em g/L no crescimento microbiano ao longo de 72 h a partir de melaço de cana-de-açúcar (1 %). N=3 (média), 200 rpm, 37 °C e razão de aeração 0,4

Ao avaliar o crescimento microbiano utilizando apenas o melaço de cana-de-açúcar como única fonte de substrato e sem suplementação adicional observamos uma significativa redução no parâmetro de crescimento. No parâmetro crescimento determinado pelo peso seco observa-se um crescimento 6 vezes menor do que aquele promovido pela presença de uma fonte de nitrogênio (extrato de levedura) ao processo.

Ao avaliar a concentração de substrato ao longo do cultivo, observou-se uma diferença de 8,86 g/L ao longo de todo o processo, sugerindo que o microrganismos foi capaz de consumir esta quantidade de carboidrato que foi bem próxima ao consumo nas condições de presença de nitrogênio mas que este não foi capaz de promover o crescimento nesta nova condição (Fig. 9). Levando em consideração o comportamento ao longo de todo o experimento e ignorando o último ponto de análise, conclui-se que o consumo no geral foi em torno de 4 g/L.

O crescimento celular muito baixo quando comparado com condição de presença de nitrogênio adicional. Ao comparar as duas situações, podemos observar que o crescimento celular através do peso seco foi cerca de 6 vezes menor do que a condição de presença de nitrogênio. O nitrogênio apresenta-se como imprescindível para o crescimento celular e

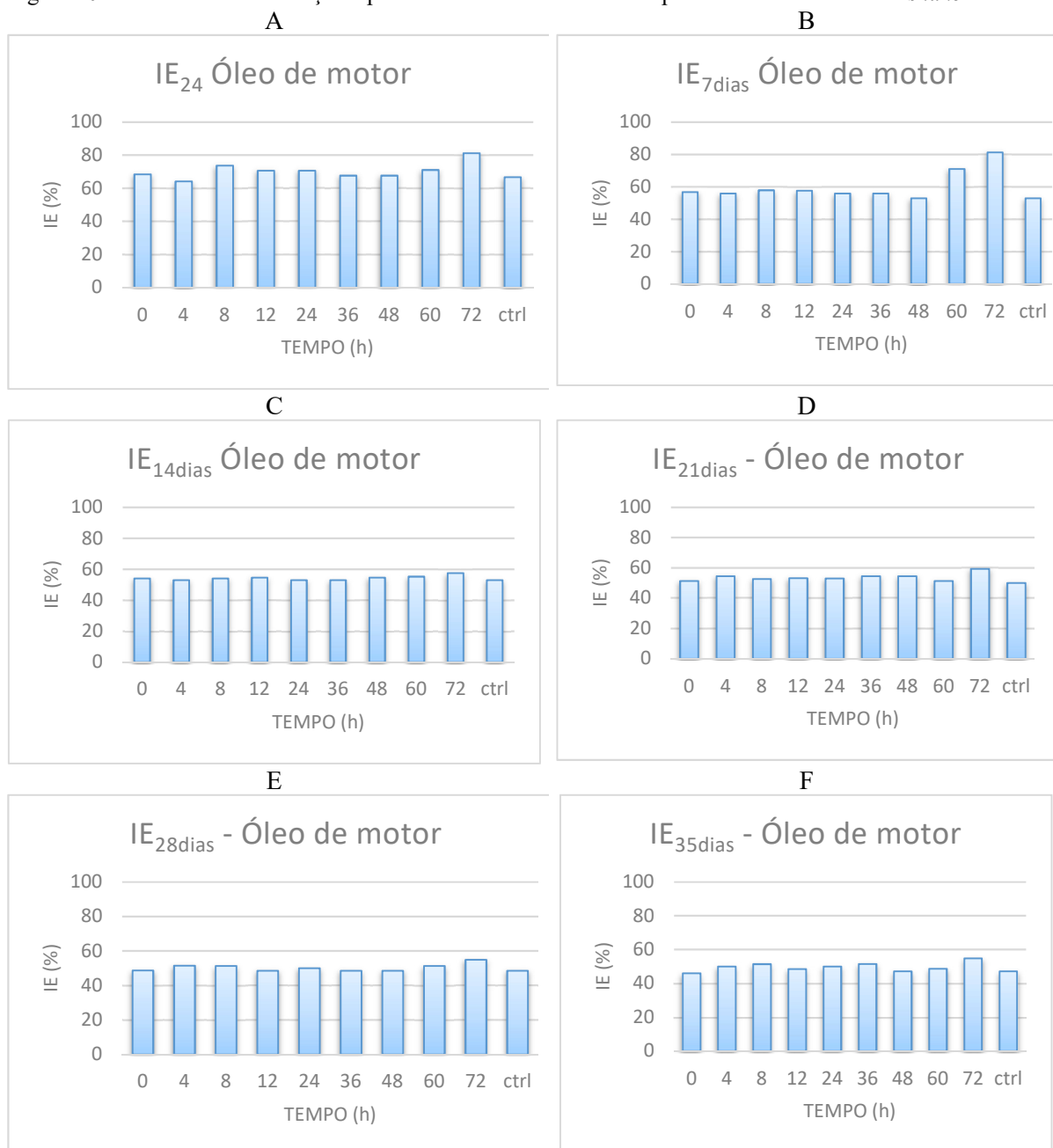
acúmulo de biomassa, uma vez que sua ausência pode impactar de forma expressiva no crescimento celular e em todas as situações metabólicas.

Os sobrenadantes das amostragens em tempos regulares também foram usados para avaliação da capacidade de emulsificar diferentes hidrocarbonetos (óleo de motor, óleo vegetal e querosene) que apresentam distintas viscosidades.

5.1.2 Índice de emulsificação (IE24)

Ao utilizar o sobrenadante livre de células a partir do cultivo realizado na ausência de nitrogênio adicional para avaliar o índice emulsificação, observamos que apenas as amostras após 72 h de cultivo foram expressivamente superiores ao controle em IE24 (A) e IE168 (B) (15 e 30 % a mais), os demais pontos de amostragem apresentam valores similares ao do controle quando comparados (C, D, E, F). Vale salientar que o próprio meio de cultura apresenta uma certa capacidade de emulsificar o óleo de motor (Fig. 10).

Figura 10 – Índice de emulsificação a partir dos sobrenadantes dos experimentos cultivados em *shaker*

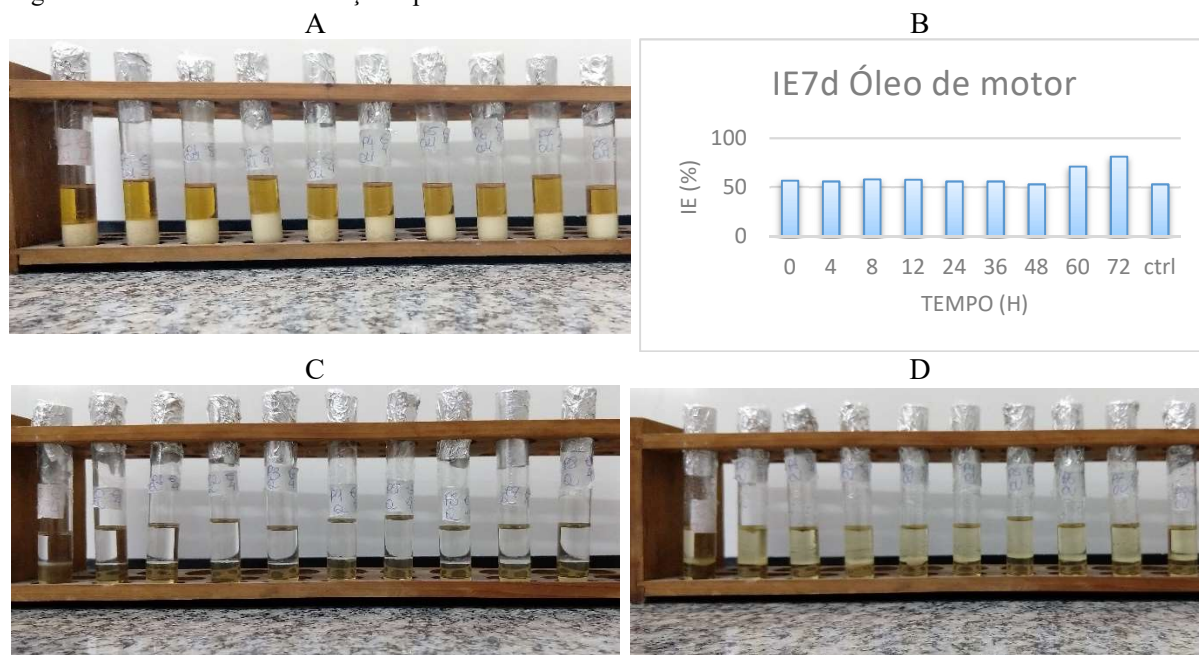


Índice de emulsificação (IE) em óleo de motor a partir do sobrenadante do cultivo (72 h) em meio com melaço de cana-de-açúcar (1 % p/v) e utilizando *Bacillus safensis* MF326565 como produtor e avaliado ao longo de 35 d de emulsificação. Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C e razão de aeração 0,4.

De acordo com as análises realizadas ao longo dos 35 dias para avaliar a estabilidade do biossurfactante, observa-se que houve uma pequena diferença entre o último ponto de amostragem (72 h) e o controle, evidenciando a possível produção de biossurfactante de forma tardia e que este foi capaz de emulsificar o óleo de motor. Os demais pontos de amostragem apresentaram uma certa homogeneização e que esta não difere do controle.

Os outros hidrocarbonetos utilizados (querosene e óleo vegetal) não apresentaram emulsificação com o sobrenadante do cultivo nesta mesma condição, permanecendo inalterados e com as fases líquido e óleo bem demarcados (Fig. 11)

Figura 11 - Índice de emulsificação a partir dos sobrenadantes cultivados em shaker.



Índice de emulsificação (IE) em óleo de motor (A,B), querosene (C) e óleo vegetal (D) ao longo de 72 h de cultivo a partir de sobrenadante livre de células cultivados em meio com melaço de cana-de-açúcar (1 % p/v) utilizando *Bacillus safensis* MF326565 como produtor e avaliado por 7 d de emulsificação. Da esquerda para a direita: controle, 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h. Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C e razão de aeração=0,4.

Ao avaliar o índice de emulsificação no cultivo em que foi adicionado nitrogênio a partir de extrato de levedura (1 % p/v), observa-se uma capacidade emulsificação (IE₂₄) nos três hidrocarbonetos utilizados, porém com maior porcentagem em óleo de motor. O biossurfactante produzido apresenta uma maior capacidade de emulsificar o óleo de motor que é o mais viscoso dentre os hidrocarbonetos utilizados na inferência indireta da presença de biossurfactante (Fig 12). Pode-se observar ainda a presença de uma pequena emulsificação em óleo vegetal nos pontos (4,5,7,8) que representam respectivamente 24, 36, 60 e 72 h, mostrando que em 24 h é um bom momento de produção de biossurfactante, pois foi possível observar uma excelente emulsificação de óleo de motor, além de apresentar uma sutil emulsificação em óleo vegetal.

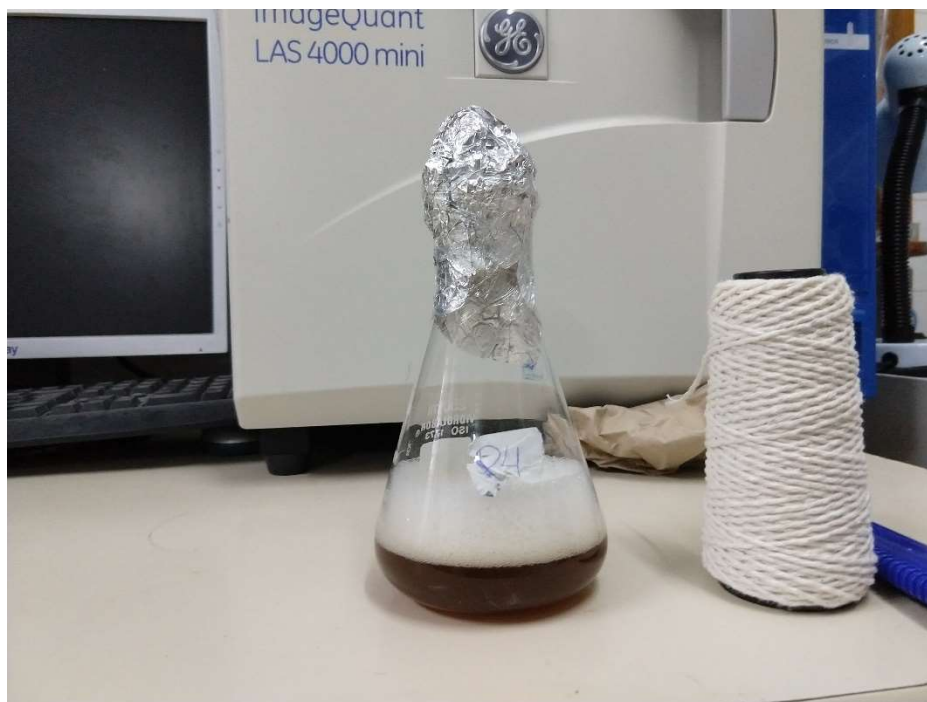
Figura 12 – Índice de emulsificação a partir dos sobrenadantes dos experimentos cultivados em *shaker*



Índice de emulsificação (IE24) em óleo de motor (A), óleo vegetal (B) e querosene (C) a partir do cultivo de 72 h, sobrenadante livre de células cultivados em meio com melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura (1 % p/v), e utilizando *Bacillus safensis* MF326565. Da esquerda para a direita: controle, 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h. Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C e razão de aeração=0,4

Em 12 horas de cultivo, observou-se uma intensa formação de espuma no frasco de cultivo e este por sua vez apresentou um bom IE, demonstrando que a produção de biossurfactante pode ter alguma relação com a fase exponencial de crescimento (Fig. 13).

Figura 13 – Produção de espuma a partir do crescimento em *shaker*

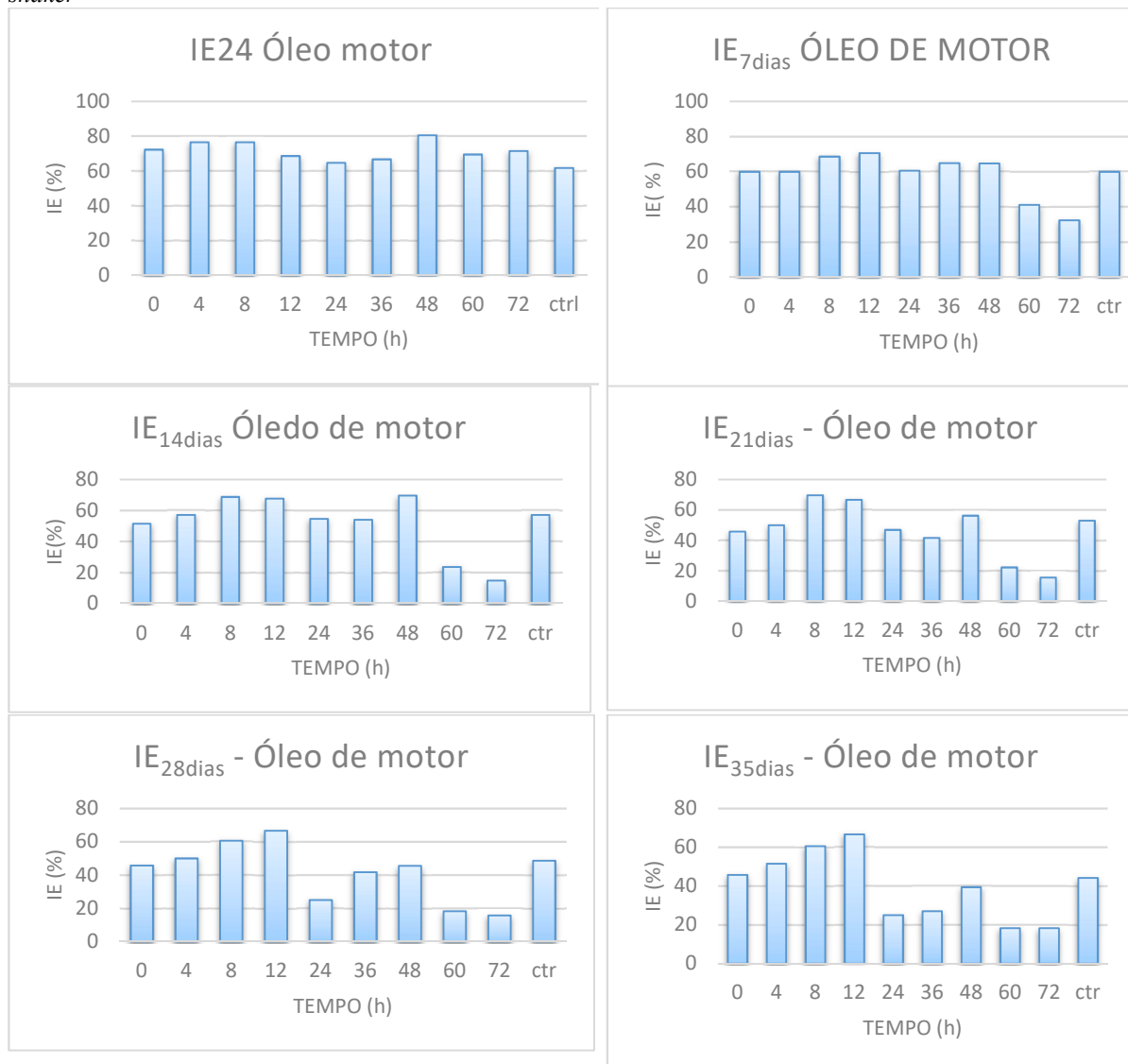


Crescimento de *Bacillus safensis* MF326565 após 12 h de cultivo a partir de melaço de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura 1 % (p/v) em *shaker*. Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C e razão de aeração 0,4.

A Figura 14 mostra a variação no índice de emulsificação quanto a estabilidade ao longo do tempo. Pode-se observar que há uma forte estabilidade nos pontos iniciais de amostragem e que se mantém superior ao controle, com destaque aos pontos de amostragem 3 e 4 (12 e 24 h) que apresentaram o maior valor de IE e estável em até 35 d de avaliação. Este acompanhamento de estabilidade foi realizado durante 75 d (1800 h) e os mesmos pontos mantiveram-se estáveis (Fig. 15-G).

Observa-se que há uma tendência de instabilidade na emulsificação logo após as 24 h para os pontos (60 e 72 h), seguido pelos outros pontos ao longo dos dias de acompanhamento, e que se acentua à medida que o tempo passa, estes por sua vez apresentaram índice de emulsificação inferior ao controle.

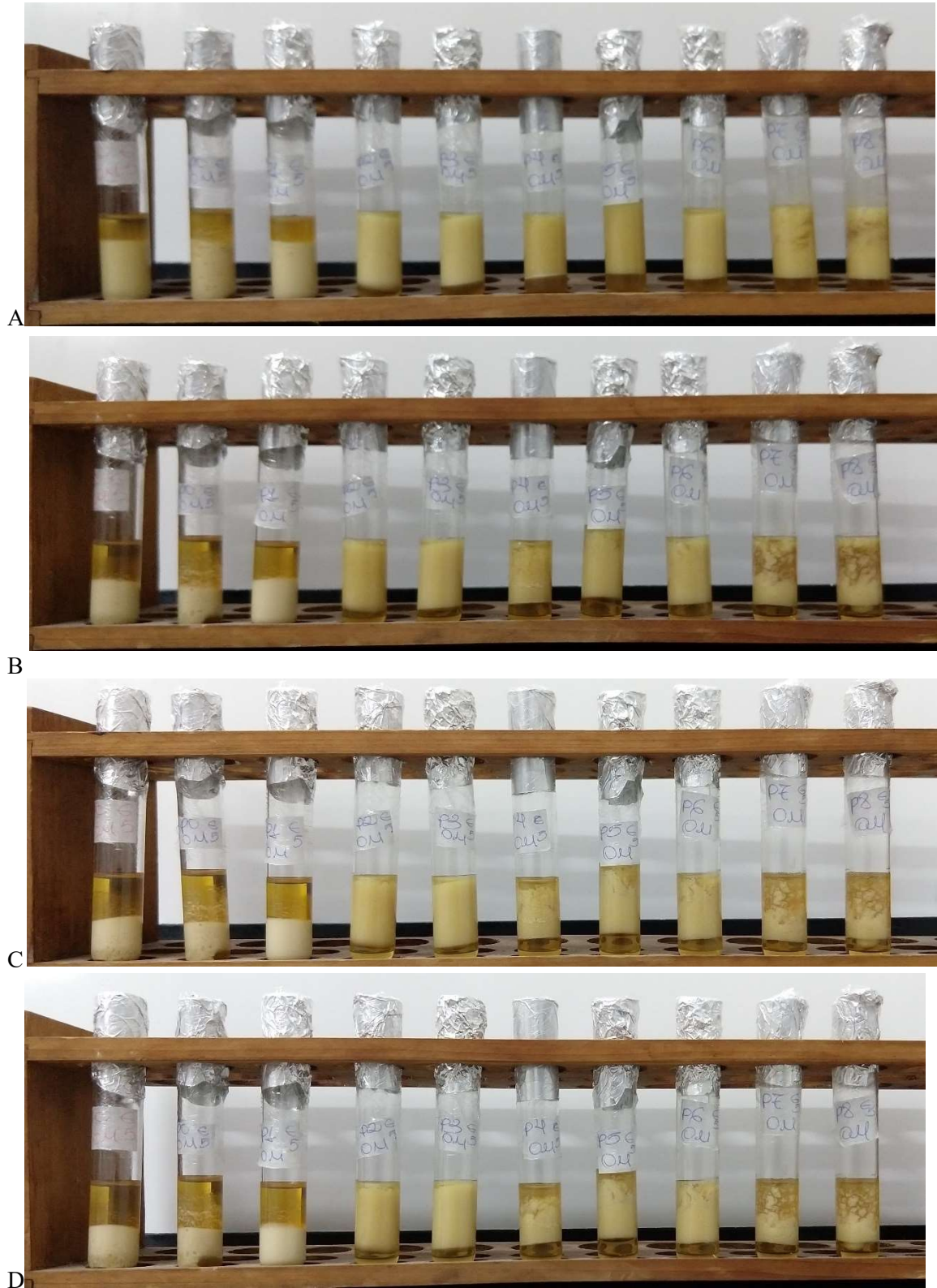
Figura 14 – Índice de emulsificação ao longo de 35 dias de análise a partir de sobrenadantes cultivados em *shaker*

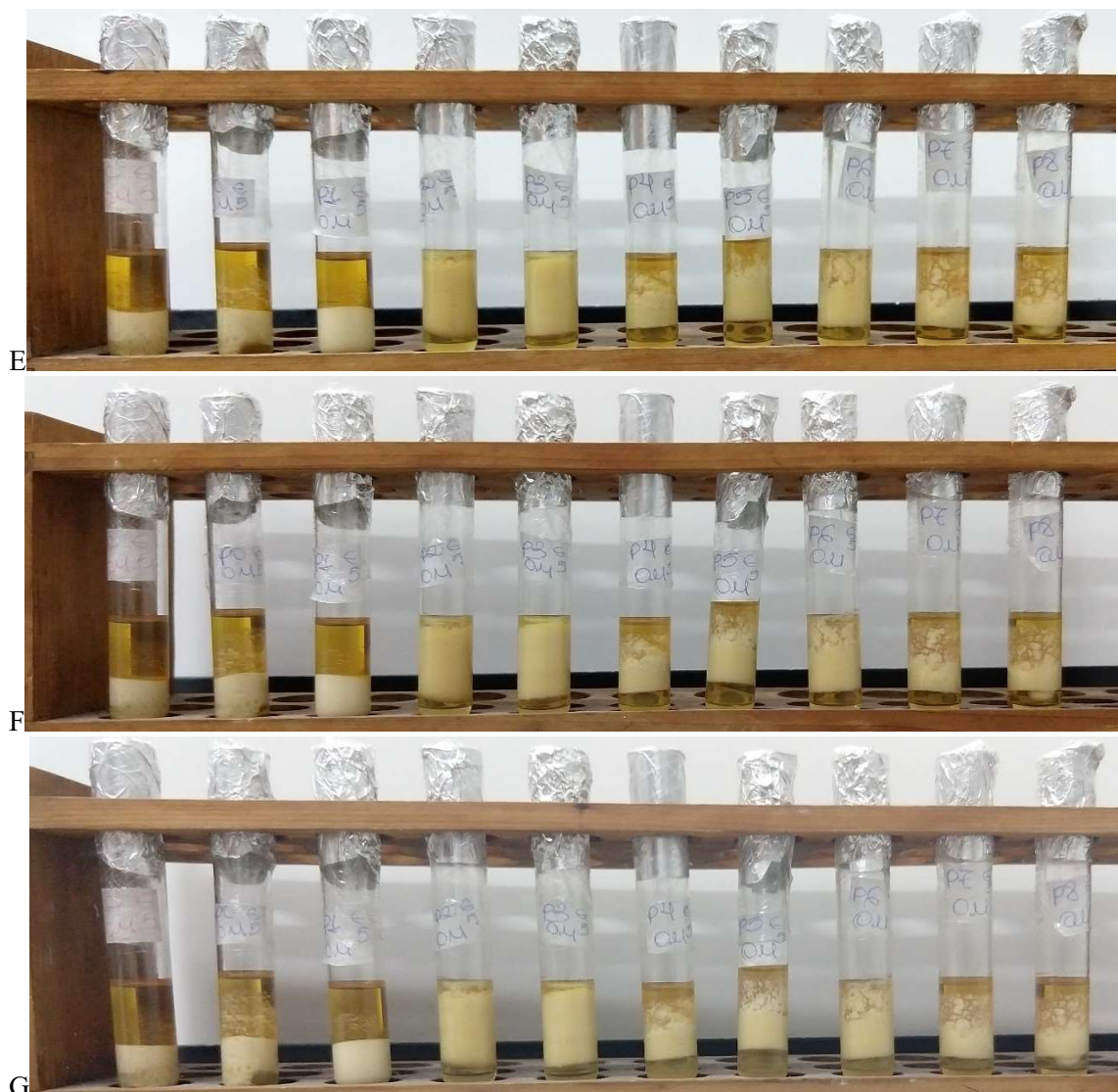


Índice de emulsificação (IE) em óleo de motor ao longo de 72 h de cultivo a partir de sobrenadante livre de células cultivados em meio com melaço de cana-de-açúcar e na dependência de nitrogênio (1 % p/v) utilizando *Bacillus safensis*, MF326565 como produtor e avaliado ao longo de 35 d de emulsificação. Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C e razão de aeração 0,4.

De acordo com a observação dos tubos com o emulsificado percebe-se que em sua maioria há uma certa quantidade de meio que não participou da emulsão, logo podemos inferir que o índice seria muito mais satisfatório caso todo o conteúdo do meio fosse utilizado na emulsificação do óleo (Fig. 15). Ao longo da avaliação do IE pode-se observar que ao passar do tempo a estabilidade vai se comprometendo e as amostras mais tardias do cultivo apresentam uma maior instabilidade, com apresentação inferior ao controle.

Figura 15 – Índice de emulsificação ao longo de 75 dias em óleo de motor a partir do sobrenadante do cultivo em *shaker*





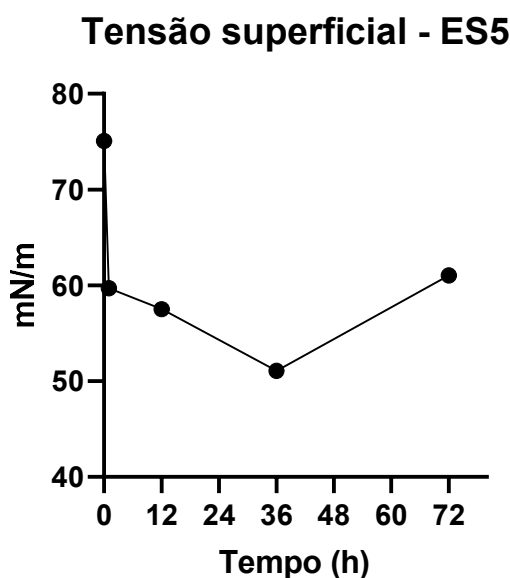
Crescimento a partir do melaço como substrato, extrato de levedura (1 % - p/v) e *Bacillus safensis* MF326565. Sobrenadante livre de células onde: A (24 h), B (7 d-168 h), C (14 d-336 h), D (21 d-504 h), E (35 d-840 h), F (45 d-1080 h), G (75 d-1800 h). Da esquerda para a direita: controle, 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h. Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C e razão de aeração=0,4.

5.1.3 Avaliação da tensão superficial (mN/m)

Ao avaliar a tensão superficial do sobrenadante que melhor apresentou emulsificação em óleo de motor e nos demais hidrocarbonetos testados nestes ensaios de emulsificação, verificou-se que o sobrenadante do ponto de amostragem 36 horas do cultivo com 1 % de melaço e 1 % de extrato de levedura no cultivo em Erlenmeyer apresentou a maior redução da tensão superficial de 75 mN/m do meio para 51 mN/m, uma redução de 32 % (Fig. 16). Brzozowski et al. (2011) ao trabalhar com *Lactobacillus fermenti* e *Lactobacillus rhamnosus* obteve valores de tensão superficial de 55, 60 e 65 mN/m. Ao utilizar o melaço para o cultivo de *Lactobacillus* spp. Mouafo et al. (2018) obteve valores de tensão superficial com baixa

variação quando comparado com o melaço (51,71 – 47,50 mN/m) e uma menor redução quando a produção foi conduzida na presença de glicerol, demonstrando mais uma vez o potencial biotecnológico exibido pelo melaço de cana-de-açúcar para a produção de biossurfactante frente aos substratos convencionais. A alta capacidade de emulsificação e a baixa redução da tensão pode estar associada ao complexo molecular presente no biossurfactante. A alta atividade superficial dos diferentes sobrenadantes observada pode ser explicada pelo fato de que os sobrenadantes provavelmente conterem biossurfactantes compostos de uma mistura molecular como reportado por Brzozowski et al. (2011).

Figura 16 – Avaliação da tensão superficial (mN/m)



Tensão superficial (mN/m) demonstrada pelo sobrenadante que apresentou melhores resultados em IE₂₄ em óleo de motor, referente ao cultivo em incubadora orbital e utilizando *Bacillus safensis*, MF326565, melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura (1 %). Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C e razão de aeração=0,4.

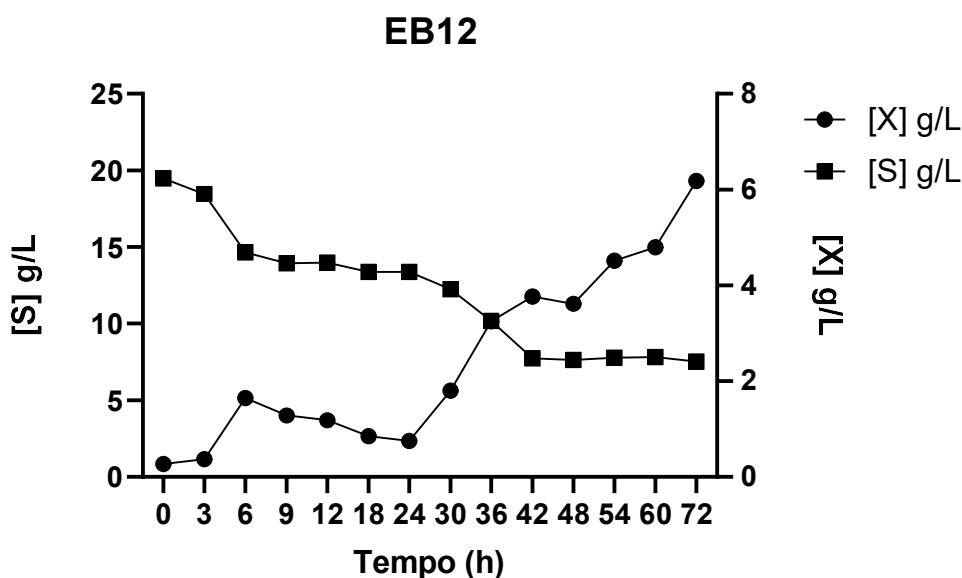
5.2 Experimentos em biorreator

5.2.1 Crescimento, consumo e produção de biossurfactante

Os experimentos em biorreator utilizando o microrganismo *Bacillus safensis* MF326565 e melaço de cana-de-açúcar como substrato alternativo foram conduzidos após o diagnóstico experimental de variáveis feito em *shaker*, a partir da concentração de 1 % (p/v), bem como a mesma concentração de nitrogênio na forma de extrato de levedura (1 % p/v), pois os resultados mostraram-se bem promissores quanto a produção de biossurfactante expressa em emulsificação em óleo de motor e redução da tensão superficial.

No ensaio EB12 (Experimento Biorreator condição 1 e repetição 2 (1 % melaço e 1 % de extrato de levedura – p/v)), observa-se que o crescimento atingiu uma fase exponencial ao longo das 6 primeiras horas e depois um leve declínio até as 24 h seguintes, seguidos por um aumento exponencial de crescimento com uma produção máxima em concentração de 6 g/L após 72 h de cultivo (Fig. 17). De acordo com o consumo de substrato, a utilização deste para o crescimento e produção de biossurfactante pelo microrganismo da espécie *Bacillus safensis* foi em torno de 13 g/L, com um grande consumo nas 6 primeiras horas, convergindo com a primeira fase exponencial de crescimento.

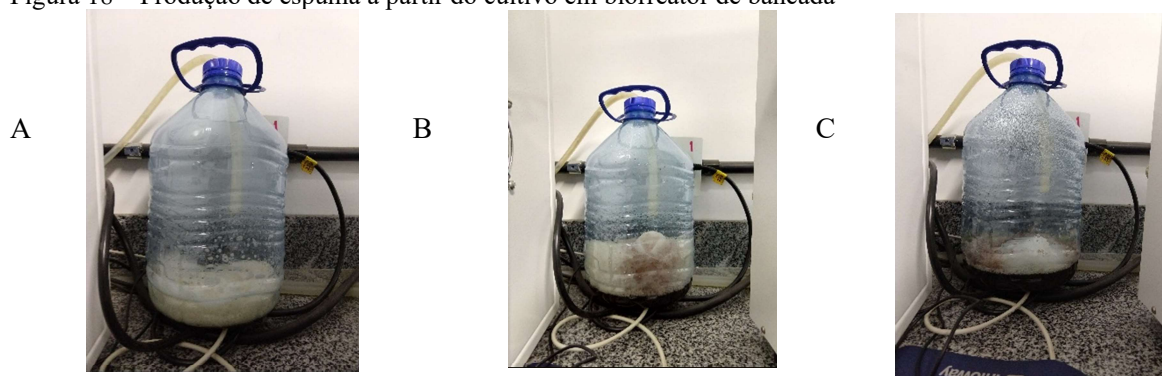
Figura 17 – Crescimento e consumo de substrato do experimento cultivado em biorreator de bancada



Desempenho do *Bacillus safensis* MF326565 em biorreator (EB12) para o parâmetro crescimento [X] e consumo de substrato [S] ao longo de 72 h na dependência de 1 % de melaço e 1 % de extrato de levedura como fonte adicional de nitrogênio. N=3 (média), 180 rpm, 37 °C, pH: 6,8

Foi possível observar que o experimento em biorreator utilizando *Bacillus safensis* MF326565, melaço como substrato alternativo e com extrato de levedura como fonte de nitrogênio uma grande produção de espuma com apenas 6 horas de cultivo e que esta foi aumentada gradualmente até cerca de 24 horas (Fig. 18). Os mesmos resultados foram observados por Coutte et. al. (2010), em que a espuma era bem presente no cultivo em biorreator a partir de 6 horas de cultivo após inóculo.

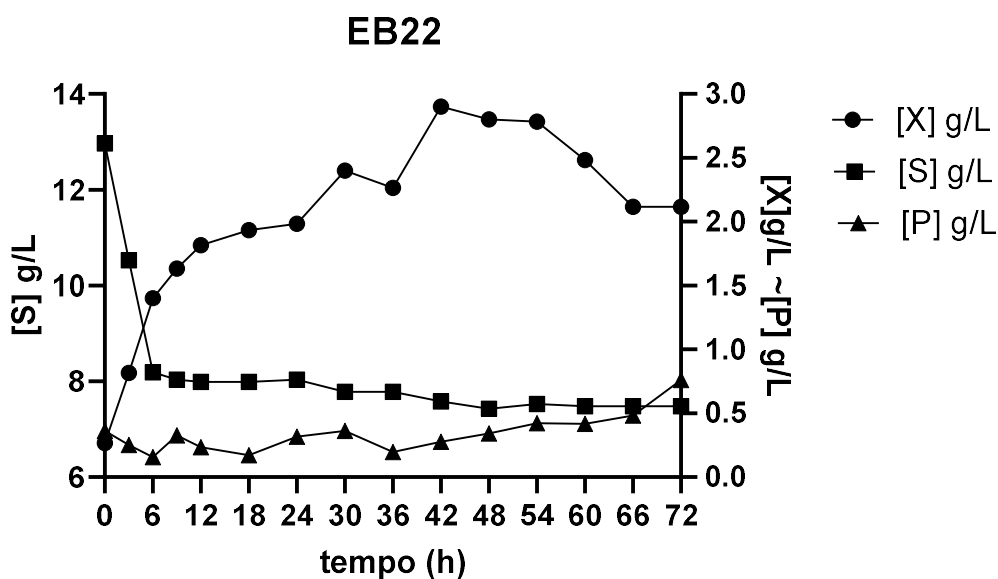
Figura 18 – Produção de espuma a partir do cultivo em biorreator de bancada



Espuma produzida pelo *Bacillus safensis* MF326565 (EB12) utilizando melaço de cana de açúcar como substrato e extrato de levedura como fonte de nitrogênio (1 % p/v) através da fermentação em biorreator de bancada. Condições: 180 rpm, 37 °C, pH: 6,8. As letras A, B e C referem-se às horas de cultivo (6, 9 e 24 h), respectivamente

Ao reduzir a quantidade de substrato de 1 para 0,5 % (p/v) e mantendo a concentração de nitrogênio em 1% (p/v) (EB22 – condição 2 e repetição 2) observa-se uma concentração celular em torno de 3,0 g/L em 46 h de cultivo (Fig. 19).

Figura 19 – Crescimento, consumo de substrato e acúmulo de produto do experimento em biorreator de bancada



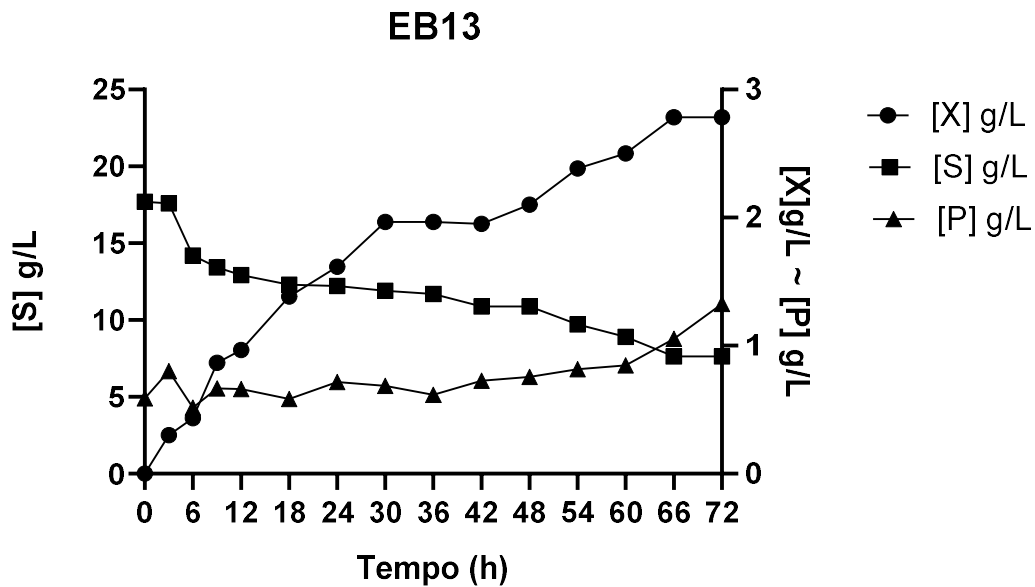
Desempenho do *Bacillus safensis* isolado MF326565 em biorreator para o parâmetro crescimento [X], consumo de substrato [S] e acúmulo de produto ao longo de 72 h na dependência de 0,5 % de melaço e 1 % de nitrogênio (Extrato de levedura). N=3 (média), 180 rpm, 37 °C, pH: 6,8.

Em relação ao consumo de substrato observa-se que há um grande consumo nas 6 primeiras horas de cultivo (5 g/L) e que converge com a fase exponencial, demonstrado pelo crescimento do *Bacillus safensis* MF326565 nas condições estabelecidas. Ao longo do experimento não foi possível detectar mudança brusca em consumo de substrato, no entanto, é suficiente para duplicar o crescimento bacteriano a partir das 6 primeiras horas até o final do

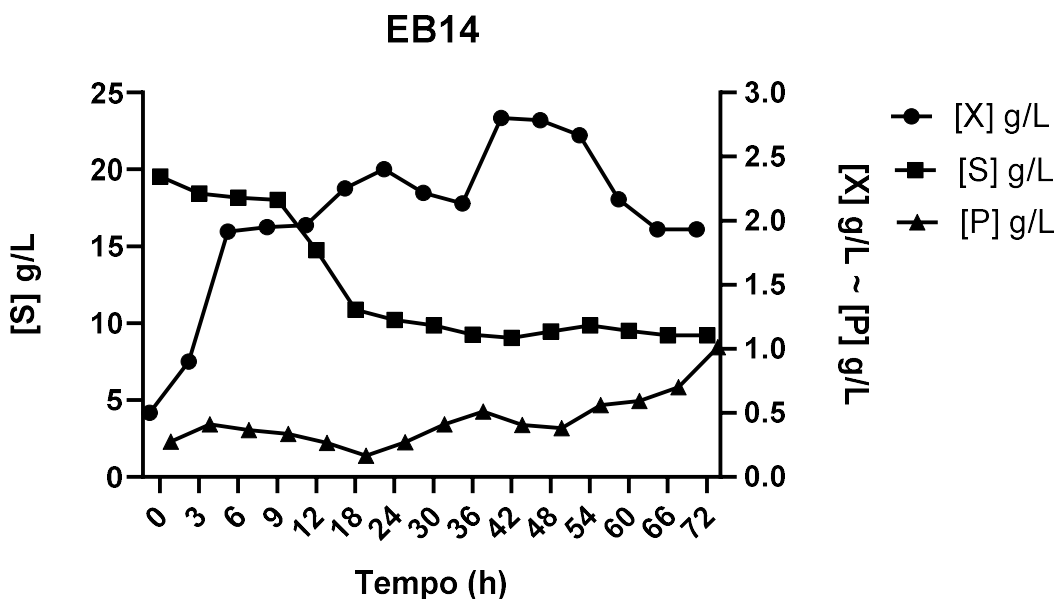
processo (3,0 g/L). No parâmetro de acúmulo de produto destaca-se uma produção de $\pm 0,4$ g/L em todo o processo e com uma leve tendência de maior acúmulo a partir das 36 h. Este pode estar relacionado com o nível de meio de cultivo na cuba que não favorece a formação de mais espuma e tampouco a eliminação da mesma pelo condensador. Ao avaliar a quantidade de produto presente no frasco coletor de espuma que representa o produto na sua forma bruta foi possível obter $\pm 0,7$ g/L remanescente.

Para os experimentos de avaliação da reprodutibilidade dos parâmetros em biorreator observou-se um comportamento diferenciado quanto ao crescimento na fase exponencial, porém nota-se que o platô atingido se mantém em $\pm 3,0$ g/L de células em ambos os experimentos conduzidos (EB13 e EB14 e também no EB22) (Fig. 14).

Figura 20 – Crescimento, consumo de substrato e acúmulo de produto do experimento cultivado em biorreator de bancada



A



B

Desempenho do *Bacillus safensis* isolado MF326565 em biorreator: EB13 e EB14 (A e B) para o parâmetro crescimento [X], consumo de substrato [S] e acúmulo de produto [P] ao longo de 72 h na dependência de 1 % de melaço e 1 % de Nitrogênio (Extrato de levedura). n=3, 180 rpm, 37 °C, pH: 6,8.

5.2.2 Parâmetros cinéticos em biorreator

Os parâmetros cinéticos avaliados ao longo da análise dos dados para os experimentos em biorreator demonstram certa variação no que diz respeito ao comportamento dos processos, no entanto observa-se que para o parâmetro produtividade em célula (P_X) nos três experimentos em discussão ($EB22=0,074$; $EB13=0,079$ e $EB14=0,097$ g/L.h⁻¹), verifica-se que existe certo padrão no acúmulo de células quando há normalização em 18 h de cultivo, culminando com a fase exponencial e expressiva produção de espuma (Fig. 18).

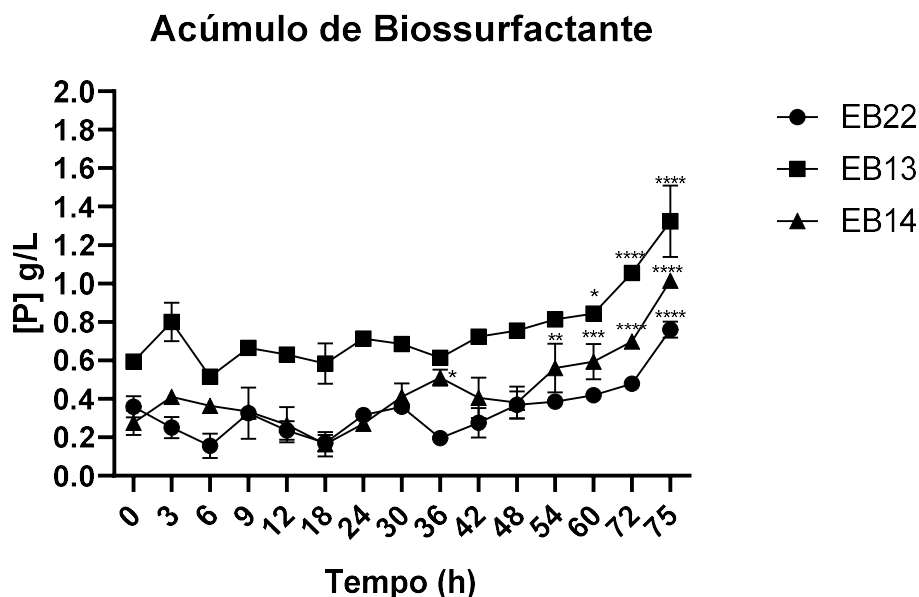
As velocidades específicas de crescimento, substrato e produto (μ_X , μ_S e μ_P) apresentaram valores bem diferentes após linearização da fase exponencial ($\mu_{m\acute{a}x}$) na qual obtém-se parâmetros de análise para os experimentos. O μ_X do EB13 (0,0683 g/Lh⁻¹), EB14 (0,2361 g/Lh⁻¹) e EB22 (0,1561 g/Lh⁻¹) apresentou tal comportamento devido a possível variação existente no pré-inóculo, visto que a concentração celular inoculada foi obedecendo a faixa estipulada em metodologia (0,6-0,8 de O.D. em 600 nm) e isto pode ter influenciado no desenvolvimento do microrganismo, além de variações inerentes ao equipamento, pois oscilações nos parâmetros físicos (temperatura, pH e oxigênio dissolvido) podem ter provocado tais variações. Adamczak & Bednarski (2000) observaram que a melhor condição para a

produção de surfactina foi de 1 L/min de aeração e mantendo o oxigênio dissolvido em 50 % de saturação, assim, possibilitando o acúmulo de 45,5 g/L de surfactina.

Ao avaliar o rendimento total em g/L de células ao longo de 72 h de cultivo em biorreator, observa-se uma concentração de $\pm 3,0$ g/L de células em todos os três experimentos avaliados e para a produtividade em produto (P_P) destaca-se valores para EB13 (0,085 g/L.h⁻¹), EB14 (0,060 g/L.h⁻¹) e para EB22 (0,020 g/L.h⁻¹), onde tais valores foram determinados através do final das respectivas fases exponenciais.

Em relação aos fatores de conversão ($Y_{X/S}$; $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$) na fase exponencial que converge com a alta produção de biossurfactante, encontra-se valores bem distintos entre os experimentos em análise. O EB13 apresentou $Y_{X/S} = 0,220$ g/g, $Y_{P/X} = 2,464$ g/g e $Y_{P/S} = 0,089$ g/g. O experimento EB14 apresentou $Y_{X/S} = 0,171$ g/g, $Y_{P/X} = 15,74$ g/g e $Y_{P/S} = 0,010$ g/g. O EB22 apresentou $Y_{X/S} = 0,375$ g/g, $Y_{P/X} = 9,413$ g/g e $Y_{P/S} = 0,039$ g/g. Este comportamento pode estar associado as intempéries anteriormente mencionadas. Coutte et. al. (2010) obteve valores de conversão de substrato em produto de 0,73 mg/g de fengicina presente na espuma. O acúmulo de produto na espuma do experimento EB13 apresentou acúmulo de 0,089 g/g.

Em relação à Figura 15, observa-se uma diferença expressiva no acúmulo de produto nos experimentos avaliados pois a aeração nestes apresentou variação nas primeiras 24 horas de cultivo, visto que é neste momento onde há crescimento exponencial (dados identificados em *shaker*) e que a quantidade de oxigênio dissolvido além de favorecer o crescimento promove também a formação/eliminação de espuma do biorreator. O experimento que apresentou o maior acúmulo de produto na espuma coletada foi o EB13 com aproximadamente 1,325 g/L de produto nestas condições. O experimento EB14 não apresentou problemas quanto a aeração e apresentou acúmulo de produto na espuma em torno de 1,0 g/L no frasco coletor e no caldo fermentado cerca de 0,7 g/L. Observa-se diferença significativa entre o acúmulo de todos os produtos coletados na espuma em relação ao controle que no caso foi o ponto 0 amostral, com diferenças bem expressivas (Fig. 15). Nota-se que os últimos pontos de coleta que apresentaram acúmulo significativamente diferentes do início do cultivo com destaque para todas as espumas, representadas pelo ponto de 75 h.

Figura 21 – Produção e acúmulo de biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565

Experimento conduzido em biorreator de bancada na presença de melaço e extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio (0,5 e 1 % - p/v – EB22; 1 % p/v – EB13 e EB14) ao longo de 72 h do processo fermentativo. Médias (n=2), barras correspondem ao erro padrão da média. ANOVA e médias comparadas pelo teste de Bonferroni com nível de significância $P<0,05$ (*), $P<0,01$ (**), $P<0,001$ (***), $P<0,00001$ (****).

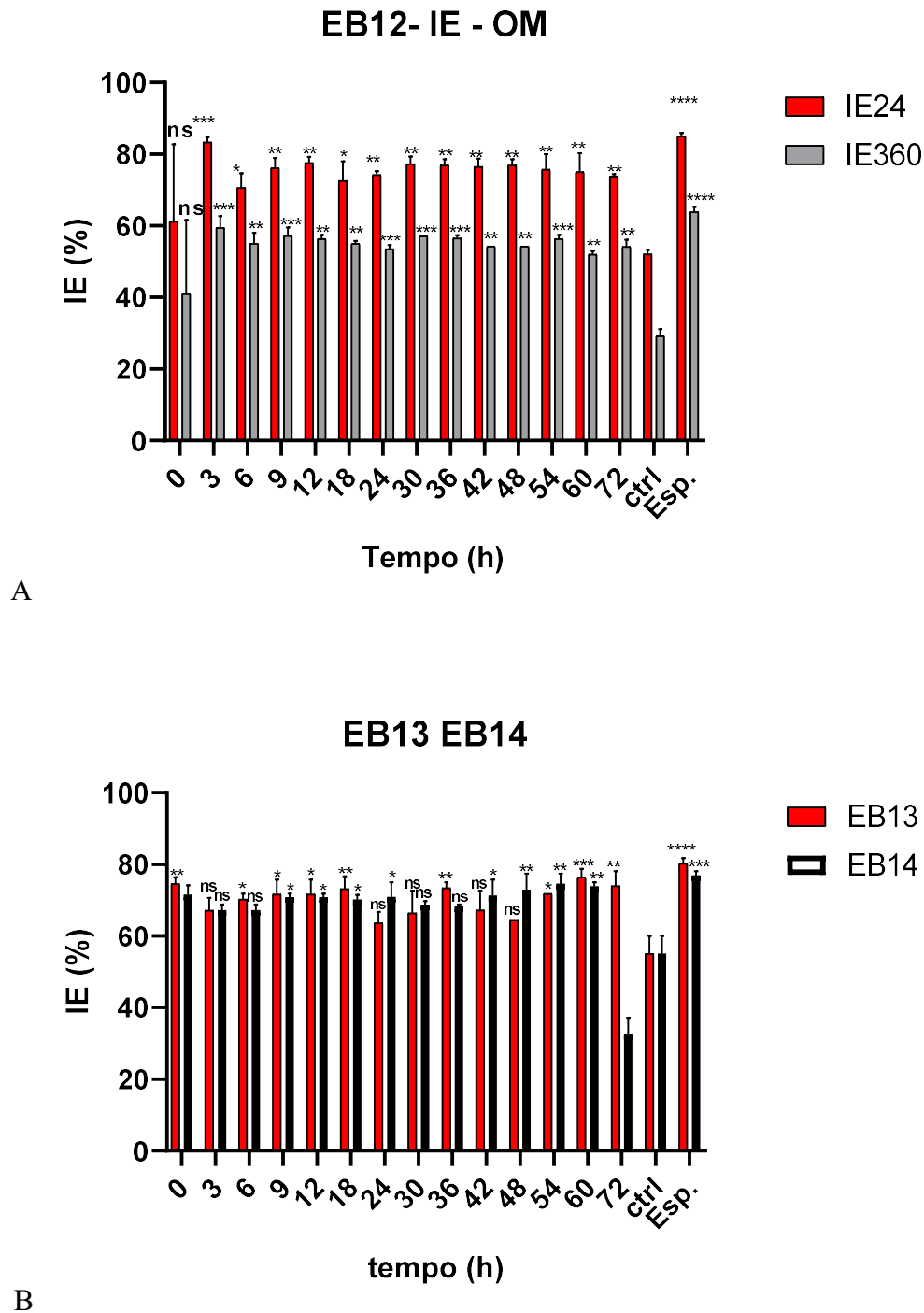
A produtividade em produto (PP) apresentada pela análise dos experimentos em biorreator demonstrou valores aproximados para EB13 e EB14 (0,085 e 0,061 g/L.h⁻¹) a partir das análises do final da fase exponencial de cultivo. O experimento EB22 apresentou valor de PP em torno de 0,019 g/L.h⁻¹ de produtividade nas mesmas condições.

5.2.3 Índice de emulsificação (IE24)

No índice de emulsificação para as amostragens feitas em biorreator podemos observar que em todos os pontos que foram misturadas ao óleo de motor apresentaram-se superiores ao controle (Fig. 23) e que não foi possível observar nenhuma mudança em relação ao óleo vegetal. Observa-se que a espuma utilizada para emulsificar o óleo de motor apresentou os maiores valores de emulsificação, superando o controle e os demais pontos de amostragem, com valores de 85 % de emulsificação onde o controle apresentou apenas 53 % (Fig. 22). Observa-se ainda, que os dados referentes a espuma diferem do controle com nível de significância e superiores aos demais pontos de coleta pois demonstrou maiores médias de emulsificação (IE) e que permaneceu estável por 360 h. Todos os pontos amostrais também apresentaram alta

significância ao comparar com o controle (Meio + óleo de motor). Estes dados reforçam a importância da aeração no processo fermentativo pois favorece a liberação de mais produto e que este apresenta-se mais concentrado.

Figura 22 – Índice de emulsificação em óleo de motor a partir de sobrenadante de experimento cultivado em biorreator de bancada

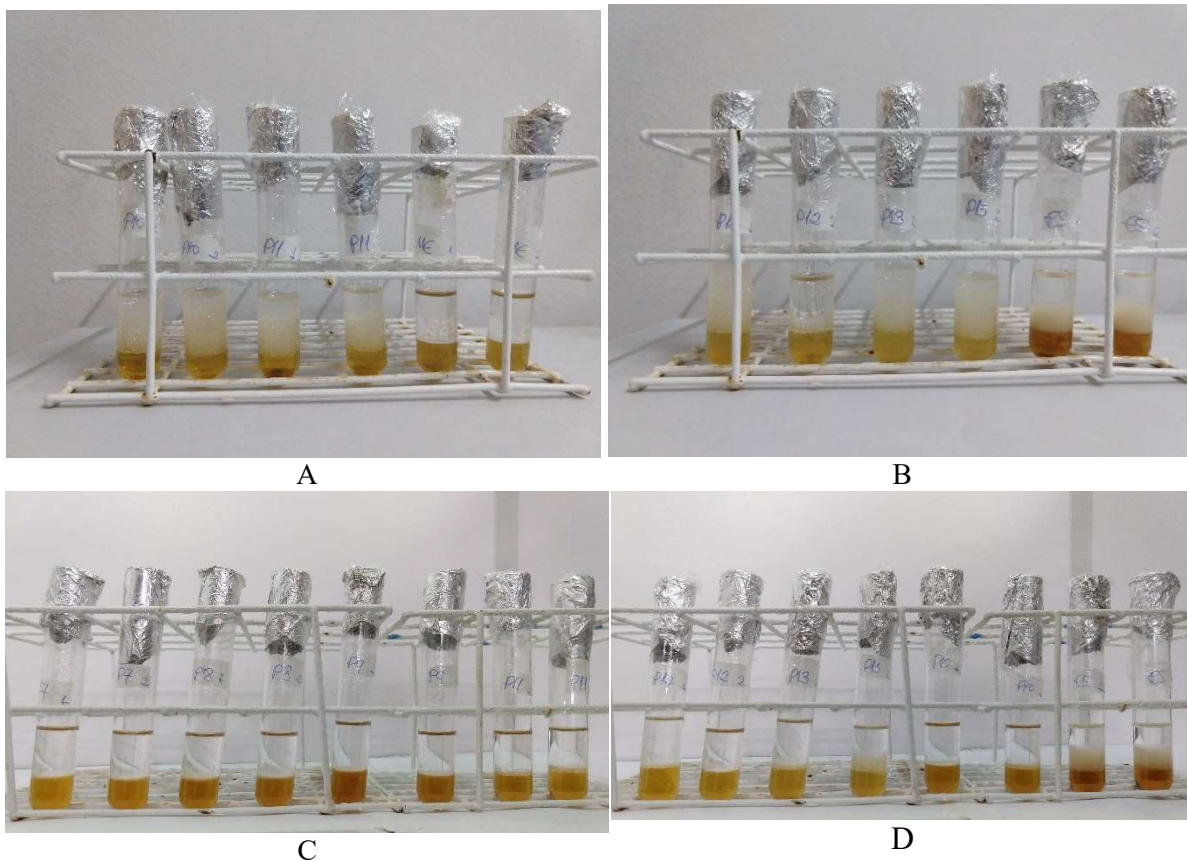


Índice de emulsificação em óleo de motor ao longo de 72 h de cultivo utilizando melaço como substrato, extrato de levedura (1 % - p/v) e *Bacillus safensis* MF326565. Sobrenadante livre de células e hidrocarboneto (óleo de motor), onde: A corresponde ao primeiro ensaio (EB12) avaliado 24 h e 360 h após mistura e B as repetições (EB13 e EB14). Condições de cultivo: 200 rpm, 37 °C. Médias (n=2), barras correspondem ao erro padrão da média. ANOVA e médias comparadas pelo teste de Bonferroni com nível de significância $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), $P < 0,00001$ (****).

Ao avaliar a estabilidade ao longo do tempo do índice de emulsificação, observa-se que todas as emulsões foram estáveis e mantiveram-se superiores ao controle por 15 dias (360 horas) e aquele no qual foi utilizado a espuma apresentou os maiores valores de emulsificação (65 %) quando comparado ao controle (30 %) e aos demais pontos de amostragem que apresentaram emulsificações acima de 50 % e estatisticamente superior ao controle e aos pontos amostrais (Fig. 22-A). Em relação aos experimentos EB13 e EB14 verifica-se o mesmo padrão de emulsificação com ênfase nas espumas (líquidas) que apresentaram médias com diferença estatística bem expressiva e muito superior ao controle (Fig. 22-B). Os demais pontos amostrais também apresentaram diferenças em relação ao controle, evidenciado assim a presença de biossurfactante no caldo fermentado.

No querosene a partir do sobrenadante do experimento EB12, nota-se a formação de emulsão com a espuma resultante do processo e que esta promoveu uma emulsificação de 30 % e estável por 30 d (Fig. 23-D). Os pontos de amostragem e o controle não apresentaram emulsificação, exceto os pontos tardios (48 – 72 h) que apresentaram microemulsões dispersas, estáveis por 96 h, mas que não apresentou estabilidade por 30 d como aconteceu com a espuma (Fig. 23-A e B). Para os experimentos EB13 e EB14 observamos a presença de emulsificação bastante evidente para este hidrocarboneto (Fig. 17 - A).

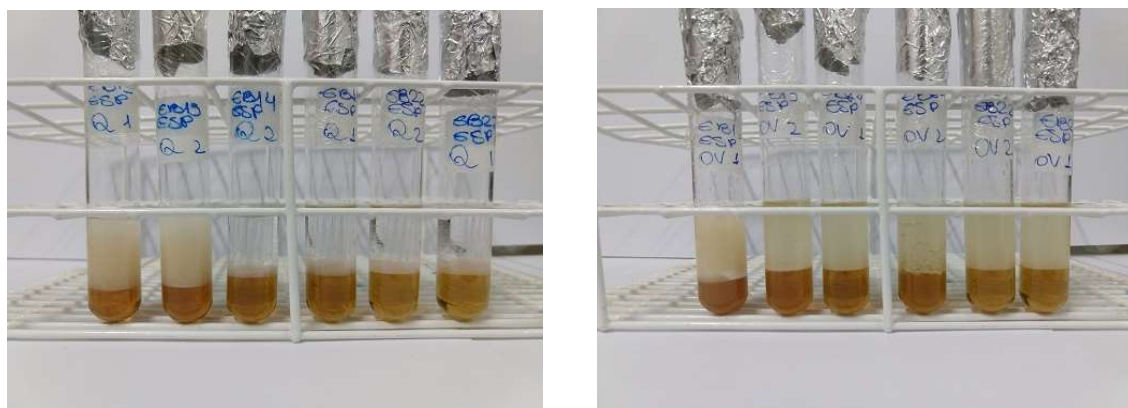
Figura 23 – Microemulsões e índice de emulsificação em querosene a partir do sobrenadante coletado em amostras regulares e espuma coletada em biorreator de bancada



Experimento conduzido em biorreator de bancada a partir do melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura (1 % - p/v) e *Bacillus safensis* MF326565, EB12. Sobrenadante livre de células produzido sob as condições: 180 rpm, 37 °C e pH: 6,8. Da esquerda para a direita: A (48-54 h e o controle (meio+óleo) com duas repetições), B (60-72 h e espuma com duas repetições) em 24 h após homogeneização em vórtex, C (30-36-42-54 h com duas repetições) e D (60-72-48 h com duas repetições) em 30 d após homogeneização em vórtex.

O biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 tem maior atividade em óleo de motor, porém a espuma apresenta grande atividade em querosene e baixíssima atividade em óleo vegetal (Fig. 24-A). A espuma do experimento EB13 apresentou maior IE₂₄ em querosene do que os outros experimentos (± 65 %), talvez por conta do maior acúmulo de biossurfactante promovido pela baixa aeração, no entanto observa-se ainda, mesmo que baixa, a presença de emulsificado nos outros tratamentos (Fig. 24-B).

Figura 24 – Índice de emulsificação em querosene e em óleo vegetal a partir da espuma coletada em biorreator



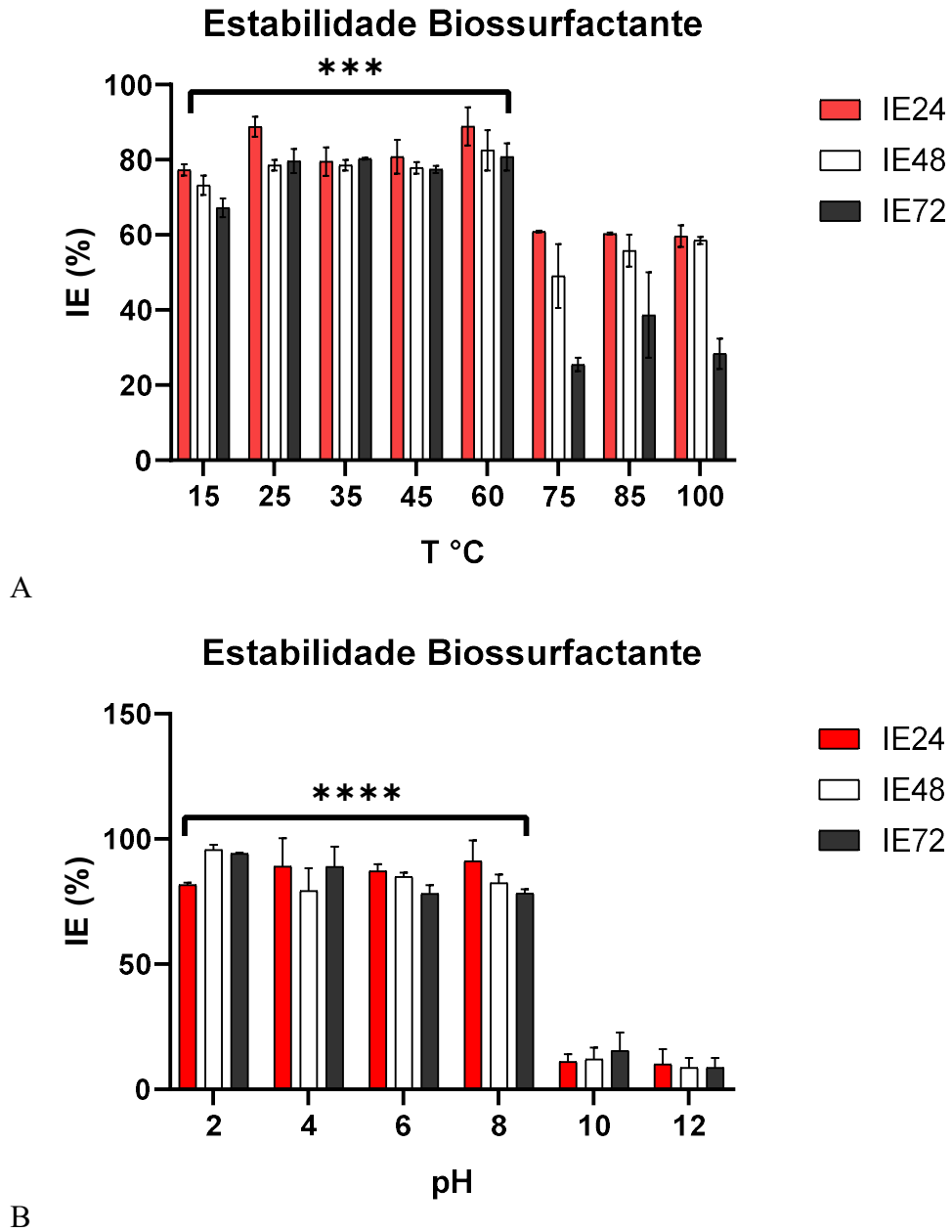
Experimento conduzido a partir do melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura (1 % - p/v) e *Bacillus safensis* MF326565, EB13 e EB14. Sobrenadante livre de células produzido sob as condições: 180 rpm, 37 °C e pH: 6,8. Da esquerda para a direita: A (EB13, EB14 e o controle com duas repetições) e B (EB13 e Eb14 e o controle com duas repetições) em 24 h após homogeneização em vórtex.

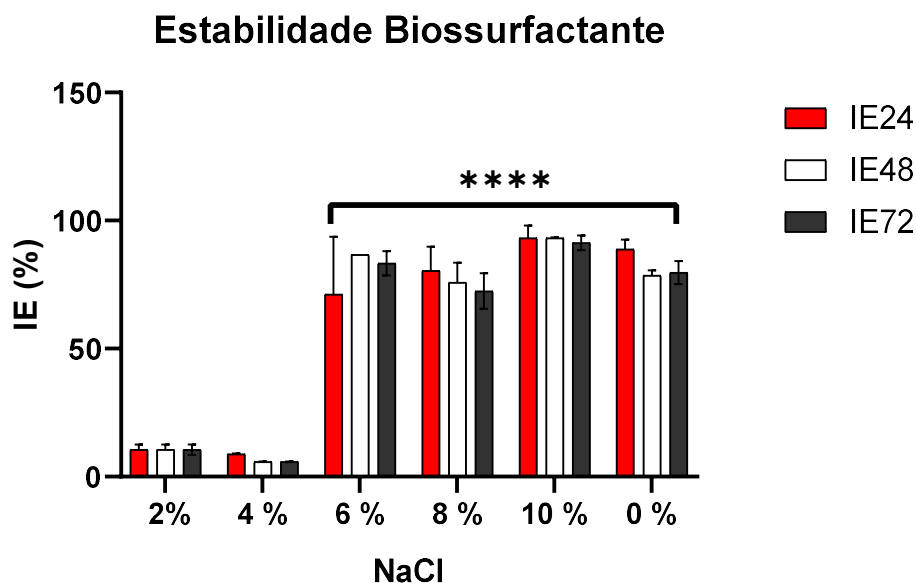
5.2.3.1 Estabilidade do biossurfactante

O biossurfactante produzido pelo *Bacillus safensis* MF326565 presente na espuma que apresentou os melhores resultados para emulsificação de óleo de motor foi testado quanto a sua capacidade de emulsificar este hidrocarboneto após variação nas condições ambientais (temperatura, salinidade e pH). No parâmetro temperatura observa-se que o biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* em 24 h de cultivo emulsificou (IE₂₄) o hidrocarboneto mesmo após o aquecimento a 60 °C (88,5 %), com variação similar ao tratamento controle a 25 °C (88,7 %). As temperaturas acima de 60 °C promoveram uma queda expressiva no índice de emulsificação, diferindo negativamente do controle e qualitativamente bem dispersas, equivalentes aquelas que em condições normais se desestabilizaram com o passar do tempo

(Fig. 15-G). Ao avaliar o IE72 verifica-se que há uma certa homogeneização nos valores, permanecendo os mesmos comportamentos, porém com uma maior homogeneidade (Fig. 25-A).

Figura 25 – Teste de estabilidade do biossurfactante no IE24 em óleo de motor a partir do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565





C

Figura 1. Teste de estabilidade frente a variação da temperatura (15~100 °C), pH (2,0~12,0) e a salinidade (2~10 % de NaCl), realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator utilizando melão de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min. Médias (n=2), barras correspondem ao desvio da média. ANOVA e médias comparadas pelo teste de Bonferroni com nível de significância $P<0,05$ (*), $P<0,01$ (**), $P<0,001$ (***), $P<0,00001$ (****).

Ao avaliar o parâmetro pH na figura 25-B, pode-se observar que a capacidade emulsificar óleo de motor se estende na faixa de pH que vai de 2,0-8,0 com diferenças significativas em relação ao controle (pH=8,0), ressalta-se que o pH da espuma inicial foi de 8,5. Os melhores resultados para o índice de emulsificação foram obtidos por Chandankere (2013) em pH: 8,0 e com leve diminuição quando este foi elevado, no entanto, nossos resultados demonstraram maior índice de emulsificação em condições ácidas (pH: 2-6). Uma diminuição no índice de emulsificação em pH 10-12 pode ser resultado de alguma alteração do biossurfactante em condições ambientais extremas (THAVASI et al., 2007)

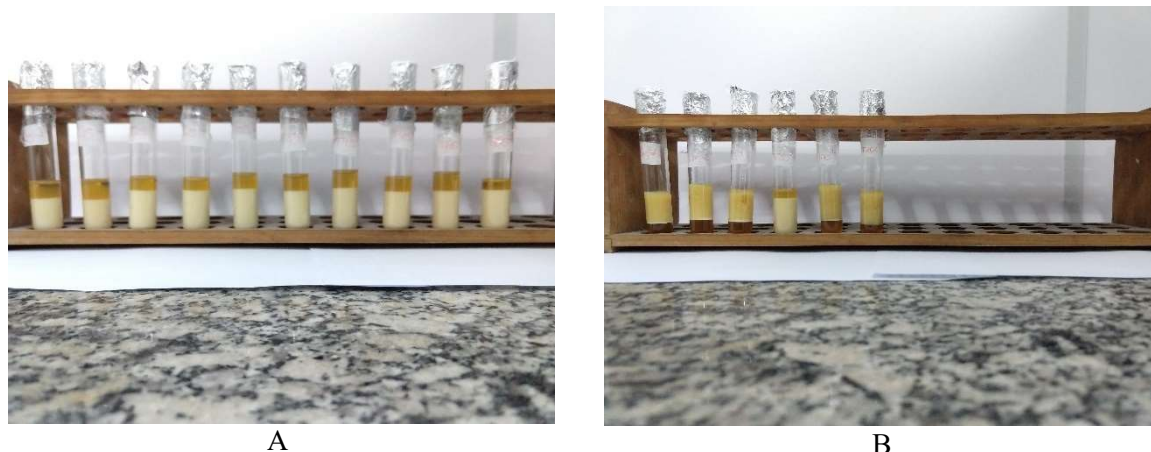
Em relação a salinidade na figura 25-C, observa-se uma certa incoerência, uma vez que as menores concentrações de NaCl não demonstraram emulsificação do óleo de motor e concentrações mais elevadas foram equivalentes à condição normal (T 25 °C e 0 % salinidade). Resultados similares foram obtidos por Chandankere (2013) que verificou a presença de boa emulsificação de óleo de motor ao adicionar 6 % de NaCl (p/v) ao sobrenadante livre de células e que também não demonstrou precipitação em condições elevadas 8-12 % NaCl (p/v). Os mesmos resultados foram similares aos trabalhos de Shavandi et al (2011) que obtiveram uma baixa emulsificação em condições de baixa salinidade 2-3 % de NaCl (p/v) e uma boa emulsificação em condições elevadas de salinidade (10 %). O mesmo autor ainda ressalta que essa tolerância à força iônica oferece ao biossurfactante maior adequação para aplicações relacionadas a óleo, a maioria das quais em condições de alta concentração salina (SHAVANDI

et al., 2011). O biossurfactante produzido por isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* apresentaram estabilidade de emulsificação por 9 dias em 80 °C, na faixa de pH de 6,0-12,0 e concentração salina acima de 7 % (p/v) de NaCl (JOSHI et al., 2008).

Sendo assim infere-se que o biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 nas condições estabelecidas (1 % p/v melaço e extrato de levedura) foi capaz de produzir uma espuma com capacidade emulsificante em diversas situações (temperatura, pH e salinidade), algo bem interessante do ponto de vista da aplicabilidade deste produto, uma vez que o ambiente é bastante diverso e um bom biossurfactante é aquele que apresenta certa estabilidade em condições ambientais adversas. Chandankere et. al. (2013) observou em seus trabalhos que o biossurfactante produzido por *B. methylotrophicus* exibiu alta estabilidade quanto a emulsificação em diferentes concentrações de salinidade, pH e altas temperaturas. Elshafie et. al. (2016) também observou que o biossurfactante produzido por *B. licheniformis* permaneceu estável e com capacidade de redução de tensão superficial após variação de temperatura (40~100 °C), pH (6,0~12,0) e concentração salina acima de 4 %.

Na figura 26 observa-se de uma forma geral as diferentes formas de emulsificação para o óleo de motor nos três parâmetros avaliados em IE₂₄. Na faixa de temperatura avaliada (15~100 °C) observa-se que em altas temperaturas há uma emulsificação, porém esta não se apresenta como o controle (25 °C) que é bastante estável e padrão para as demais.

Figura 26 – Avaliação da estabilidade frente a variação de temperatura (15~100 °C) a partir do índice de emulsificação (IE₂₄) em óleo de motor



Teste realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator (EB12) utilizando *Bacillus safensis* MF326565, melaço de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min. Da esquerda para a direita: A (15, 25, 35, 45, 60 °C com duas repetições) e B (75, 85, e 100 °C com duas repetições)

Para a faixa de pH utilizada há uma diferença na coloração do emulsificado, uma vez que avalia-se a diferença de pH e esta por sua vez pode causar uma alteração na coloração do meio, já que este pode conter diversos metabólitos que possam interagir e assim modificar sua tonalidade, no entanto, observa-se uma boa emulsificação em pH que varia numa faixa que vai de 2 a 8 (Fig 20). Sousa et. al. (2014) obteve resultados similares para a estabilidade de surfactina a variação de pH (2,0~8,0) e em relação a temperatura este se mostrou estável e com capacidade de emulsificar o óleo de motor.

Figura 27 – Avaliação da estabilidade frente a variação de pH (2,0~12,0) a partir do índice de emulsificação (IE24) em óleo de motor



Teste realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator (EB12) utilizando *Bacillus safensis* MF326565, melaço de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min. Da esquerda para a direita: pH:2,0; pH:4; pH6,0; pH:8,0; pH:10,0; pH:12,0. Todos com duas repetições.

Estas análises são uma forma indireta de detecção de biossurfactante, no entanto podem surgir variações inerentes ao processo de homogeneização. Em salinidade, observa-se que altas concentrações (10 %) demonstraram um efeito emulsificante superior a condição de baixa salinidade, talvez pelo fato do sal (NaCl) interagir com a água, favorecendo assim um maior contato do biossurfactante com o óleo de motor (Fig. 28).

Figura 28 – Avaliação da estabilidade frente a variação de salinidade (2~10 % de NaCl) a partir do índice de emulsificação (IE24) em óleo de motor



Teste realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator (EB12) utilizando *Bacillus safensis* MF326565, melaço de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min. Da esquerda para a direita: 2, 4, 6, 8, 10 % de NaCl. Todos com duas repetições

5.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para obter os espectros de infravermelho foi necessário a purificação de todas as espumas pois estas apresentaram maior efeito emulsificante e que estavam mais concentradas. Em todos os ensaios observa-se uma tonalidade avermelhada e escurecida do biossurfactante, este por sua vez pode estar associado a presença de compostos no meio de cultivo que são de difícil separação (Fig. 29).

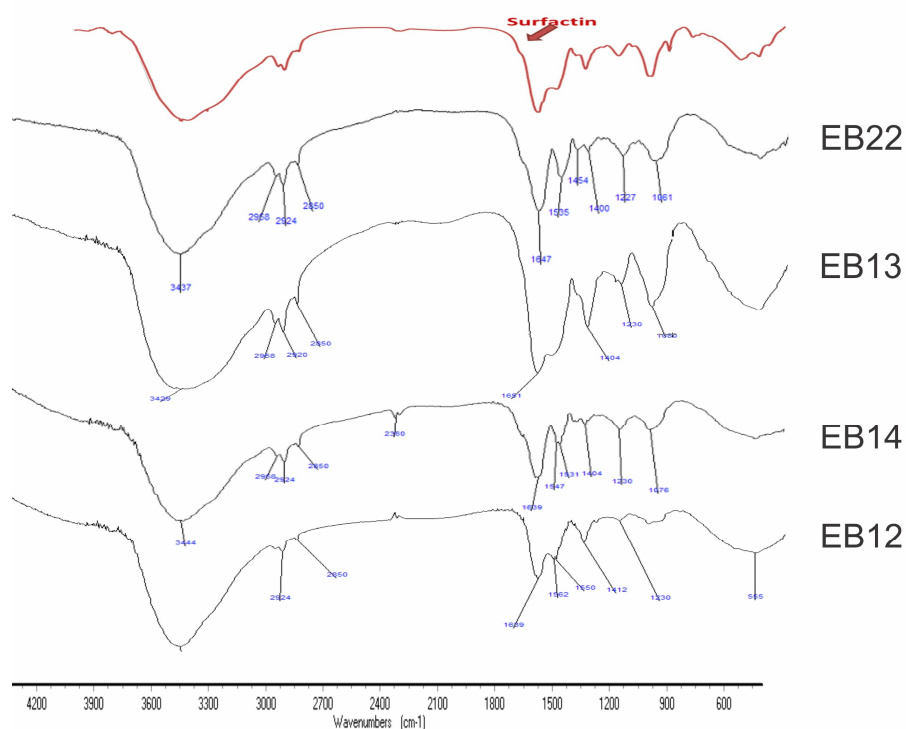
Figura 29 – Aparência do biossurfactante seco (pó) após extração e purificação



Aparência do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 (EB13) purificado após os passos procedimentais de precipitação por acidificação (pH=2,0) com HCl (P.A.), centrifugação, solubilização em água alcalina (pH=8,0) e pH ajustado, extração por solvente (diclorometano), solubilizado em metanol e seco em estufa a 85 °C.

A análise de FT-IR realizadas a partir do produto parcialmente purificado e resultado do processo em biorreator na condição estabelecida após diagnóstico feito em Erlenmeyer (1 % p/v melaço e extrato de levedura) demonstraram uma forte relação com um biossurfactante de característica lipopeptídica (Fig. 30). Observa-se uma forte absorbância em 3437 cm^{-1} que é típico do alongamento de N-H de peptídeo. A absorbância em 1639 cm^{-1} pertence à vibração de estiramento C=O (carbonila) da região amida I e em 1550 cm^{-1} é a referência de estiramento para a ligação C-N do grupo C-N-H do peptídeo. A absorbância em 2924 cm^{-1} e 1412 cm^{-1} evidencia a presença de cadeia alifática de hidrocarbonetos (BATISTA et al., 2006; CHANDANKERE et al., 2013; JOSHI et al., 2008; SHAO et al., 2015). Dada a diversidade de microrganismos e as condições de crescimento existentes nas mais áreas de pesquisa, observa-se a possibilidade de produzir lipopeptídeos a partir de diversas condições: termofílicas, utilizando o melaço como substrato e a partir de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na presença de óleo bruto a partir de *Bacillus methylotrophicus* e na microflora oral humana a partir de *Bacillus megaterium* foram capazes de produzir lipopeptídeos e que demonstraram similaridade quanto as vibrações no espectro de infravermelho com este estudo (ALTHUBIANI et al., 2018; BATISTA et al., 2006; JOSHI et al., 2008). Em relação ao *Bacillus safensis* encontramos pouca representatividade na literatura, no entanto, Domingos (2015) isolou uma espécie de *Bacillus safensis* capaz de produzir lipopeptídeo similar a surfactina que é uma referência teórica para biossurfactante e que apresentou absorbância similares a este estudo no que diz respeito a presença de cadeia alifática de hidrocarbonetos e de aminoácidos. Hanano et al (2017) ao trabalhar com *Bacillus safensis* verificou a presença de um glicolípídeo como produto do processo fermentativo, este apresentou forte semelhança com a absorbância para a presença de cadeia alifática de hidrocarboneto bem como a presença de absorbância para o grupo carbonila que em seu estudo se associa mais firmemente com um glicolípídeo que é muito comum para microrganismos do gênero *Bacillus*, uma vez que há na literatura diversos trabalhos mostrando que estes microrganismos são capazes de produzir estas moléculas. Observa-se na literatura que a presença de *Bacillus safensis* apresenta pouca representatividade nos estudos com produção de biossurfactante e destes, não há menção a produção levando em consideração uma fonte alternativa de carbono como melaço de cana-de-açúcar.

Figura 30 – Espectrograma comparativo (FTIR) do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* após cultivo em biorreator de bancada



Espectrograma de infravermelho (FTIR) do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565, realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator utilizando *Bacillus safensis* (EB12, EB13, EB14 e EB22), a partir de melaço de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min. O espectro do padrão surfactina foi obtido de Elshafie (2016).

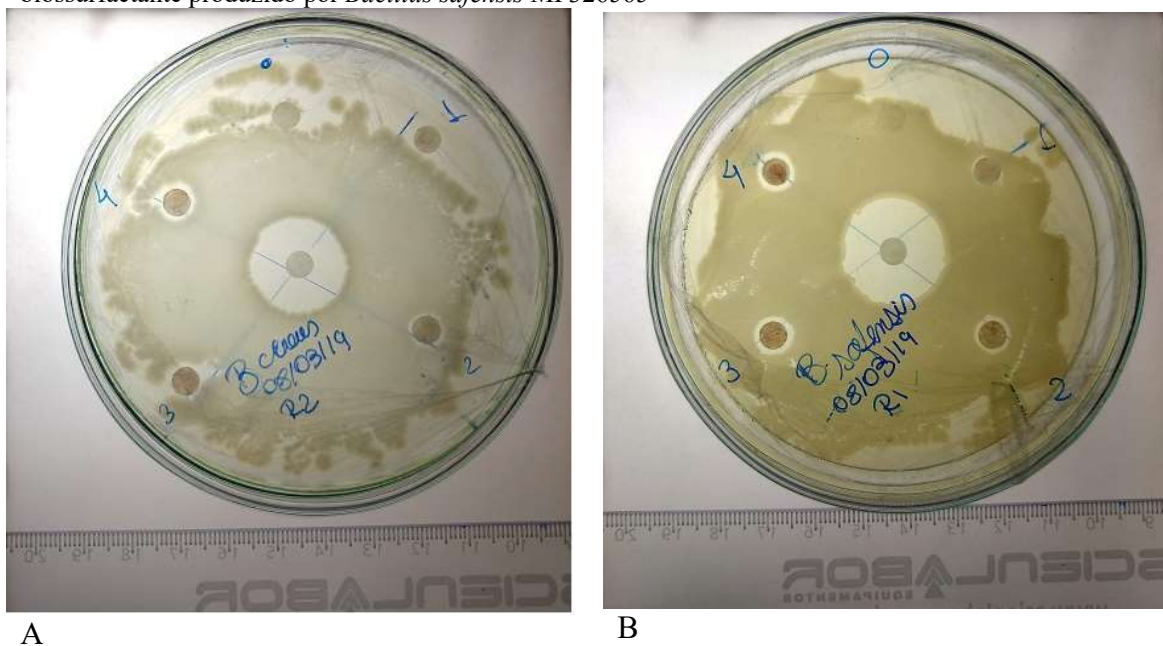
5.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Após as análises no infravermelho e as inferências acerca do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 fazer parte do grupo dos lipopeptídeos com padrão de vibração similar a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, experimentos com este composto foram idealizados para avaliar o seu efeito antimicrobiano. Para isto, testes de difusão em ágar e microdiluição foram realizados.

Após o tempo de incubação dos discos contendo o produto do processo fermentativo previamente purificado e seco além dos controles com e sem antibiótico comercial observou-se um efeito antimicrobiano em *B. cereus*, *B. safensis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* com diâmetro do halo levemente maior para o *S. aureus* demonstrando maior sensibilidade ao produto do que os demais. Não foi possível observar com clareza a presença do halo de inibição promovido pelo biossurfactante em *P. aeruginosa* mas pela avaliação qualitativa percebe-se que há regiões

de inibição e que este só poderá ser elucidado com mais detalhes através de ensaios posteriores de microdiluição em microplaca nas mesmas condições do ensaio de inibição por difusão em ágar (dados não mostrados). Percebe-se que na presença dos discos contendo diluições a partir de 25 µg/disco não há crescimento destes microrganismos. Em estudos utilizando um glicolípido produzido por *Bacillus safensis*, Hanano et al., (2017) observou que concentrações acima de 5 mg/mL não proporcionava aumento significativo na atividade antimicrobiana, porém demonstrou seletiva atividade entre os microrganismos testados (*E. coli* e *B. thuringiensis*) enquanto que os demais do estudo não foram afetados (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*). O *B. subtilis*, *E. coli*, *Acinetobacter* sp. e a *C. albicans* não demonstraram sensibilidade ao biossurfactante e cresceram normalmente na presença dos discos exceto a *C. albicans* e o *Acinetobacter* na presença do disco com canamicina (Fig. 31-A-H).

Figura 31 – Análise qualitativa do teste de inibição de crescimento por difusão em ágar a partir do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565





C



D



E



F



G



H

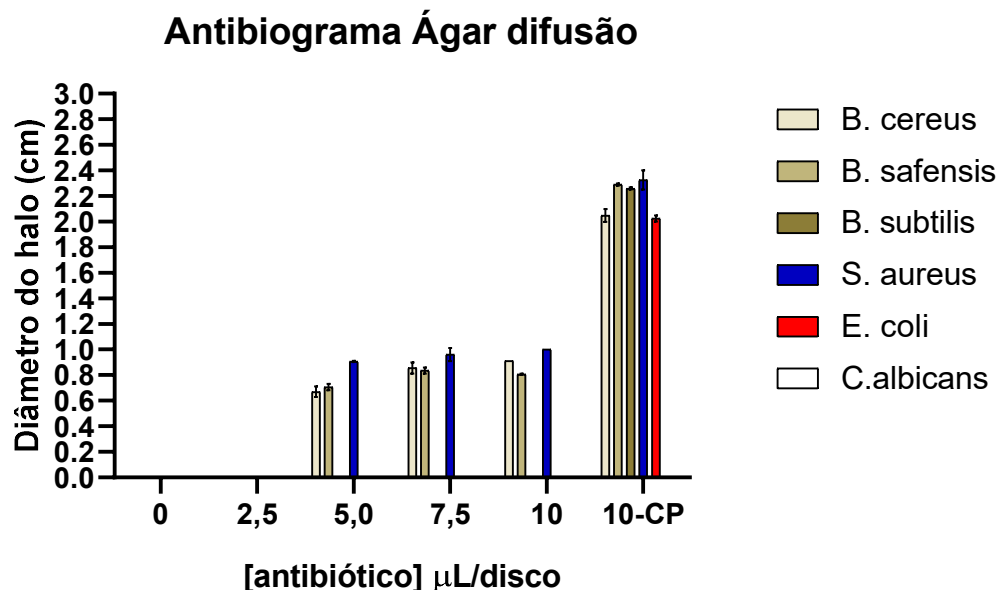
Teste realizado em diferentes concentrações do biossurfactante produzido em biorreator de bancada (1 - 12,5; 2 - 25; 3 - 37,5 e 4 - 50 $\mu\text{g}/\text{disco}$), além do controle positivo (disco central com 30 $\mu\text{g}/\text{disco}$ de canamicina) e negativo

(0 µg/disco - água destilada) nos diferentes microrganismos (A-*Bacillus cereus*; B- *Bacillus safensis*; C-*Bacillus subtilis*; D- *Staphylococcus aureus*; E-*Escherichia coli*; G-*Candida albicans*). Ensaio realizado em duplicata.

O uso de antibióticos para avaliar o efeito inibidor do crescimento de diversos microrganismos potencialmente prejudiciais é bastante útil para detectar melhores substâncias que apresentem diversas formas de atuação. Em um estudo para avaliar a sensibilidade promovida por diversos antibióticos a microrganismos que causam feridas em peles de animais, verificou-se que o gênero *Staphylococcus* apresentou maior sensibilidade a vários antimicrobianos e que na presença de Canamicina a sensibilidade foi maior que 80 % quando comparado com outros microrganismos na mesma situação de exposição (RIND; KHAN, 2000). Os lipopeptídeos produzidos por organismos do gênero *Bacillus* são muito eficazes contra diversos grupos bacterianos, incluindo Gram-positivos e Gram-negativos. Ao avaliar o efeito antimicrobiano promovido por um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*, Fernandes et al. (2007) avaliou diversos isolados do gênero *Enterococcus*, *Staphylococcus* (Gram-positivo) e do gênero *Pseudomonas* (Gram-negativo), e observou um efeito diversificado dentre os diversos isolados, mostrando diferentes níveis de sensibilidade, onde o diâmetro dos halos em *Staphylococcus* demonstrou uma média de 14,2 mm e em *Pseudomonas* uma variação entre 9,8 e 12,1 mm. Sriram et al. (2011) obteve máxima zona de inibição para *B. megaterium* (18,7 mm), porém em outros Gram (+) a média de inibição foi de 10 mm. O mesmo autor ressalta que o biossurfactante exibe alta atividade em Gram (+) quando comparado com os Gram (-). A atividade antimicrobiana dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* apresentam ação contra vários patógenos (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Em relação a avaliação quantitativa do diâmetro do halo promovido pela presença do disco contendo as mais diferentes concentrações de biossurfactante observa-se que não houve diferença significativa para o diâmetro do halo promovido pelo produto nas diferentes concentrações que variaram entre 25 e 50 µg/disco (5 e 10 µL/disco), porém observa-se uma tendência de maior sensibilidade demonstrada pelo *S. aureus* que apresentou médias de diâmetro de halo superiores aos demais positivamente sensíveis (Fig. 32).

Figura 32 – Análise quantitativa do teste de inibição de crescimento por difusão em ágar a partir do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565



Diâmetro do halo do teste de inibição de crescimento por difusão em ágar a partir de biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 em diferentes concentrações (12,5; 25; 37,5 e 50 µg/disco – 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µL/disco respectivamente), controle positivo (disco central com 30 µg/disco de Canamicina e 10 µL/disco - CP) e negativo (0 µg/disco - água destilada) nos diferentes microrganismos: *Bacillus cereus*; *Bacillus safensis*; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* e *Candida albicans*. n=4. Médias de duas repetições e as barras correspondem ao erro padrão da média.

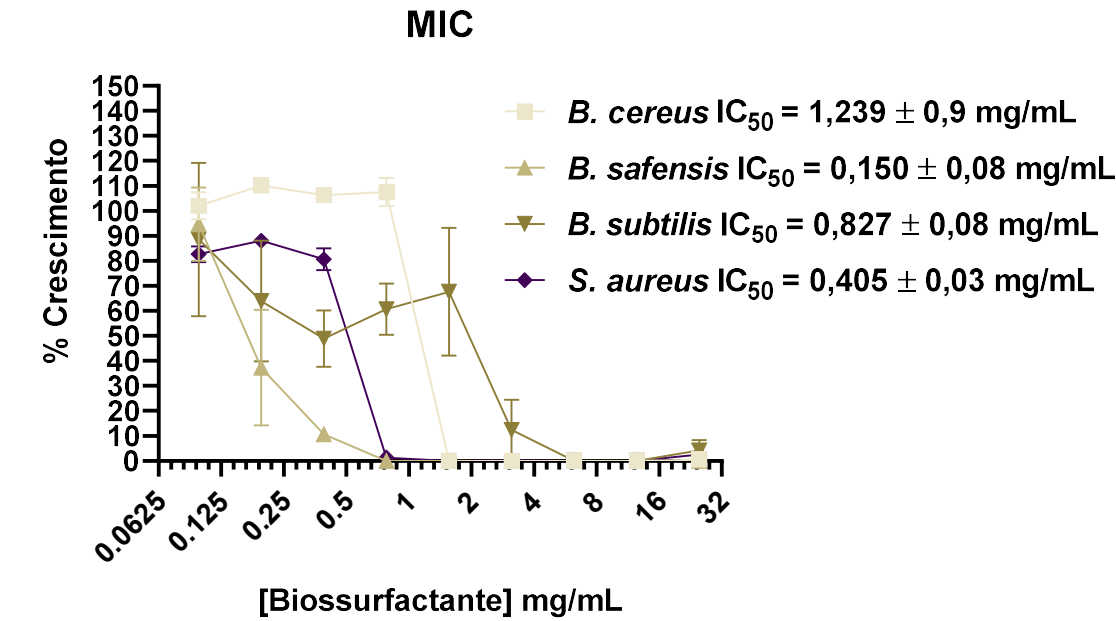
Há na literatura diversos estudos que avaliam a atividade antimicrobiana promovida por diferentes tipos de biossurfactante produzidos por diferentes grupos de microrganismos que apresentam diferentes mecanismos de ação. Jemil et al. (2017) avaliou o efeito antimicrobiano produzido por *Bacillus metylotrophicus* e obteve halo de inibição com diâmetro de (14 e 15 mm) para os Gram (+) *S. aureus* e *B. cereus* respectivamente, além de ação antimicrobiana contra *E. coli* (16,5 mm) e negativa ação contra fungos. Singh e Cameotra (2004a) observou que o um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* apresentou atividade contra vários microrganismos, especialmente contra *S. aureus* e *Mycobacterium sp.*

Após os ensaios de difusão em ágar, os microrganismos foram classificados em resistentes ao biossurfactante pois houve crescimento nas regiões de inserção dos discos e os sensíveis, onde foi possível observar alguma inibição vista macroscopicamente.

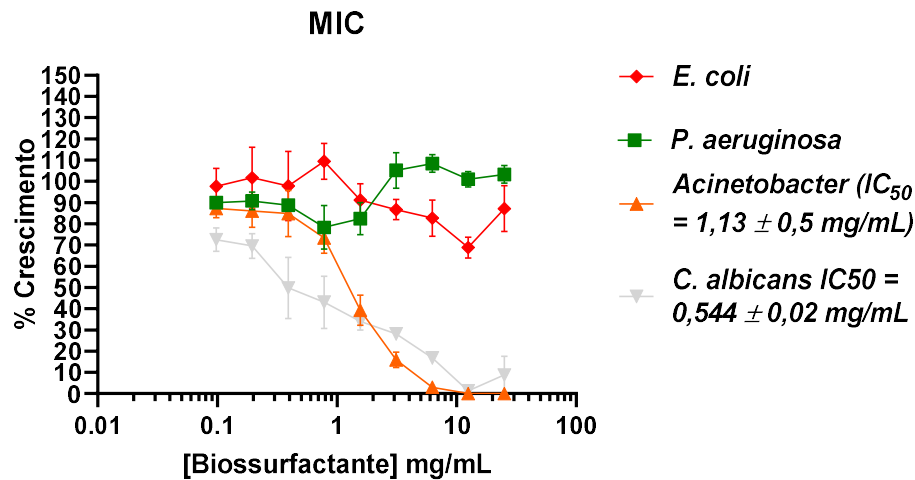
De acordo com os resultados obtidos, verifica-se que altas concentrações do biossurfactante (25 e 12,5 mg/mL) causou um efeito inibidor do crescimento em todos os microrganismos classificados como sensíveis e Gram (+), os *Bacillus* testados foram os mais afetados pela presença do biossurfactante. Para o Gram (+) *S. aureus* não foi possível observar crescimento até a concentração de 0,780 mg/mL de biossurfactante, mesmo comportamento do

B. safensis que ao contrário do *S. aureus*, apresentou um crescimento dependente da concentração do biossurfactante. Em concentrações inferiores a 0,780 mg/mL já é possível observar um crescimento de 80 % em relação ao controle. O *B. cereus* apresentou absorbância 0 até 1,56 mg/mL e em menores concentrações o crescimento não foi afetado. Em relação ao *Bacillus subtilis* avalia-se que concentrações acima de 3 mg/mL inibem o crescimento e concentrações inferiores afetam moderadamente seu crescimento (Fig. 33-A).

Figura 33 – Análise de microdiluição (CIM) a partir do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565



A



B

Análise de microdiluição para avaliar a porcentagem de viabilidade dos diferentes microrganismos (*Bacillus cereus*; *Bacillus safensis*; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* sp. e *Candida albicans*) a partir de biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 e em diferentes diluições (25~0,097 mg/mL) adicionados ao meio Mueller Hinton (125 µL/poço) em microplaca de 96 poços, incubados a 37 °C por 24 h e detectadas a 620 nm. n=18 e seus respectivos ICs.

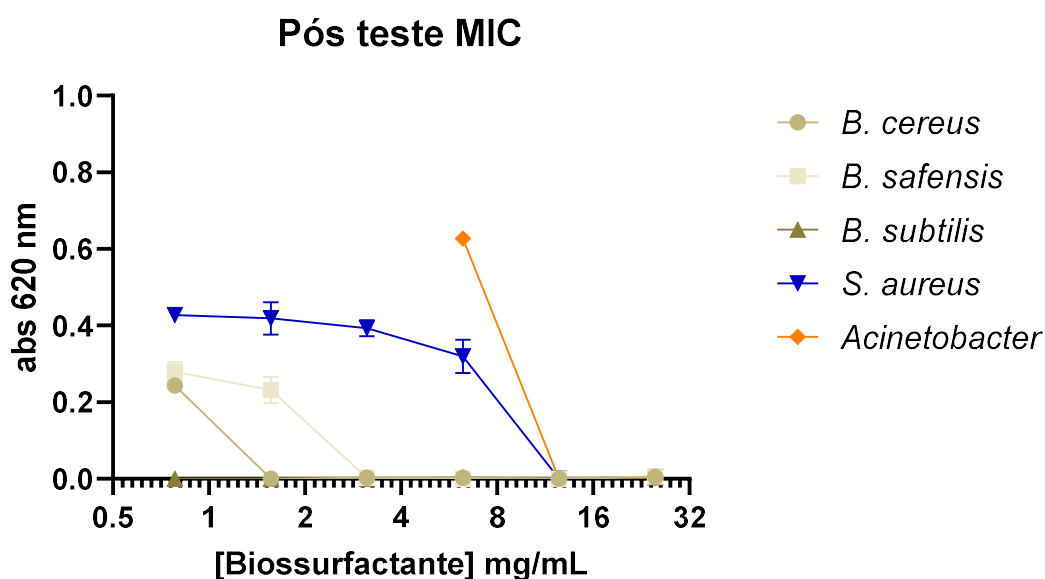
Ao avaliar o efeito do biossurfactante produzido por *Lactobacillus paracasei*, Gudiña et al. (2010) observou que altas concentrações do biossurfactante (25 mg/mL) não inibia o crescimento do *S. aureus* e que concentrações de 6,25 mg /mL permitia um crescimento de $\pm$ 25 %. Os outros microrganismos do gênero *Streptococcus* testados neste mesmo estudo não cresceram em altas concentrações, porém apresentaram crescimento nas diluições realizadas. Nosso estudo apresentou eficácia na total inibição do *S. aureus* em microplaca em concentrações de 0,780 mg/mL. O biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* apresentou ação inibitória de crescimento em *S. aureus* e *L. monocytogens* através dos testes de microdiluição realizados por Baidara et al. (2013).

Para os microrganismos testados e classificados como resistentes, observa-se que o biossurfactante em concentrações mais altas (25 e 12,5 mg/mL) promoveu um efeito totalmente inibidor do crescimento para a Gram (-) *Acinetobacter* sp. e a levedura *C. albicans* (Fig. 33-B). Jones et al. (1996) relata que agentes antimicrobianos afetam o crescimento e a multiplicação de vários tipos celulares por interação com vários alvos (químio-receptores). Esses alvos podem ser numerosos, mas com a diminuição das concentrações do agente antimicrobiano; o número de alvos também diminuiu (GOMAA, 2013). Nas demais concentrações observa-se um efeito dose dependente onde o crescimento aumenta de acordo com a diminuição da concentração do biossurfactante. A *Pseudomonas aeruginosa* e a *E. coli*, ambas Gram (-) não sentiram o efeito inibidor do biossurfactante em nenhuma das concentrações testadas. Thimon et al. (1995) relatou que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* apresentou efeito contra leveduras. Ele avaliou a iturina em diferentes concentrações e observou uma variação morfológica que poderia estar associada a um efluxo de eletrólitos e de componentes de alto peso molecular. Suas observações também sugerem um efeito na membrana nuclear destes fungos. Ndlovu et al. (2017) avaliou o efeito de surfactina e ramnolipídeo como agentes antimicrobianos e obteve resultados de inibição de crescimento por difusão em ágar para *C. albicans* e *Acinetobacter*.

Para avaliar o efeito bacteriostático ou bactericida promovido pelo biossurfactante nos diferentes microrganismos testados, uma alíquota de 12,5 µL dos poços com inibição $\geq$ 90 % das diferentes concentrações do biossurfactante no ensaio de microdiluição, foi reinoculado numa nova placa contendo meio fresco nas mesmas condições (125 µL de meio Mueller Hinton + 12,5 µL da cultura sensibilizada pelo biossurfactante após 24 h). Observa-se que o

biossurfactante foi bactericida para o *S. aureus* e *Acinetobacter* nas concentrações mais altas (25 e 12,5 m/L) e nas demais concentrações sugere-se uma ação bacteriostática. Para os *Bacillus* avaliados no pós-MIC, observa-se um efeito diferenciado entre as espécies testadas. Em escala de concentração, o biossurfactante promoveu um efeito bactericida para *Bacillus subtilis* a partir de 0,78 mg/mL, para *Bacillus safensis* de 1,56 mg/mL e para *Bacillus cereus* de 3,125mg/mL. Nas demais concentrações sugere-se o efeito bacteriostático (Fig. 34).

Figura 34 – Análise de microdiluição (pós teste) para avaliar o efeito bacteriostático ou bactericida promovido pelo biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565



Teste realizado para aqueles microrganismos que tiveram inibição do crescimento acima de 90 % após 24 h de incubação a 37 °C. Adicionados ao meio Mueller-Hinton (125 µL/poço) em microplaca de 96 poços, detectadas a 620 nm.

Em relação ao mecanismo de ação dos biossurfactantes quanto ao mecanismo de inibição na adesão celular e formação de biofilme, Deleu et al. (2005; 2008) obteve resultados que demonstraram redução da viabilidade celular e crescimento de microrganismos formadores de biofilmes através do uso de fengicina produzida por estirpes de *Bacillus*, onde concentrações crescentes desta substância causava rompimento e posterior formação de micelas a partir da bicamada lipídica. Sotirova et al. (2008) sugere que os ramnolipídeos atuam na liberação de lipopolissacarídeos para fora da membrana de Gram-negativos ou formam agregados moleculares na superfície de Gram-positivos, levando a formação de poros transmembranares ou canais no periplasma, causando modificação na permeabilidade celular.

As discussões acerca da ação de biossurfactante lipopeptídico iniciaram-se na década de 90 com vários autores evidenciando as mais diversas formas de ação antimicrobiana: aderência, deterioração da membrana e problemas nutricionais (HINGLEY et al., 1986). Inserção de ácido graxo na membrana da célula causam modificações estruturais que podem ocasionar desordem no interior da célula, modificação na condutância elétrica, aumento da permeabilidade celular (CARRILLO et al., 2003; DESAI; BANAT, 1997; THIMON et al., 1995).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos a partir do processo fermentativo utilizando *Bacillus safensis* MF326565, melaço de cana como fonte alternativa de carbono e extrato de levedura (1 % - p/v), observou-se que o *Bacillus safensis* foi capaz de produzir biossurfactante.

De acordo com os parâmetros analisados, observou-se variação quanto ao desenvolvimento do microrganismo, porém a qualidade do bioproduto não foi prejudicada.

O *Bacillus safensis* MF326565 apresentou desenvolvimento equivalente aqueles encontrados na literatura a partir de melaço e extrato de levedura ($\pm 3,0$ g/L), sendo assim, a relação C/N foi imprescindível ao processo, promovendo o acúmulo máximo de 1,36 g/L de biossurfactante.

O biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 a partir de melaço como fonte alternativa e extrato de levedura apresentou baixa redução da tensão superficial, porém ótimo índice de emulsificação com diferença significativa em relação ao controle e o emulsificado produzido apresentou estabilidade a variação de temperatura (15~60 °C), pH (2,0~8,0) e a salinidade (6~10 % NaCl). O emulsificado produzido também apresentou estabilidade ao longo do tempo com diferenças significativas mesmo após 15 d de emulsificação em óleo de motor. O produto presente na espuma apresentou boa emulsificação em óleo de motor, óleo vegetal e em querosene, evidenciando a versatilidade deste biocomposto.

O biossurfactante purificado foi caracterizado e avaliado qualitativamente por espectroscopia do infravermelho (FTIR) e apresentou espectrogramas similares ao padrão surfactina, indicando que o biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 pode ser alguma variante da surfactina.

O biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 a partir de melaço de cana como substrato alternativo e extrato de levedura apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. cereus*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *Acinetobacter* sp. Verificou-se a ação

bactericida em *S. aureus* e *Acinetobacter* sp. em concentrações partir de 12,5 mg/mL. Para o *Bacillus subtilis* (0,78 mg/mL), *Bacillus safensis* (1,56 mg/mL) e *B. cereus* (3,12 mg/mL) o efeito foi alcançado em baixas concentrações do biossurfactante. Nas demais concentrações e microrganismos testados observou-se um efeito bacteriostático (estático de crescimento em *C. albicans*) promovido pelo biossurfactante. A *P. aeruginosa* e *E. coli* não apresentaram sensibilidade ao biossurfactante.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Bacillus* é notadamente conhecido como produtor de biossurfactante e a literatura traz vários exemplos de lipopeptídeo produzidos por estes microrganismos. O isolado de solo canavieiro utilizado neste estudo e classificado como *Bacillus safensis* apresentou-se como um bom produtor de biossurfactante lipopeptídico, no entanto, para caracterizar melhor este produto faz-se necessário a utilização de técnicas mais sensíveis de detecção para melhor caracterizá-lo. Ressalta-se ainda a necessidade de realizar ensaios experimentais com outras fontes de carbono, nitrogênio e variáveis do processo para buscar a melhor relação para a produção. Testar outras metodologias de extração e purificação sempre levando em consideração os custos e a qualidade do produto. Sugere-se também a realização de outros testes biológicos para avaliar o efeito do biossurfactante quanto a recuperação de ambientes contaminados com compostos hidrofóbicos, bioprotetor, anticancerígeno, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 4, p. 313–316, 2000.
- AKPA, E. et al. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91, n. 1-9, p. 551-561, 2001.
- AL-THUBIANI, A. S. A. et al. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by *Bacillus megaterium* strain isolated from oral microflora. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2018.
- ANDRADE, R. R. Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir do hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 2012
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 10, p. 488–494, 1968.
- ASSELINEAU, C.; ASSELINEAU, J. Trehalose-containing glycolipids. **Prog. Chem. Fats Lipids**, v. 16, p. 59–99, 1978.
- BAINDARA, P. et al. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2013.
- BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995.
- BANAT, I. M. 97/02677 Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Fuel and Energy Abstracts**, v. 38, n. 4, p. 221, 1997.
- BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000.
- BANAT, P. I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, 2002.
- BARROS, F. et al. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova - QUIM NOVA**, v. 30, 2007.
- 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. 24, p. 979-985, 2008.

BATISTA, S. B. et al. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 868–875, 2006.

BECHER, P. **Emulsions: theory and practice**. 2nd. 1965.

BESSON, F. et al. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. **The Journal of antibiotics**, v. 29, n. 10, p. 1043-1049, 1976.

BRZOZOWSKI, B.; BEDNARSKI, W.; GOŁEK, P. The adhesive capability of two *Lactobacillus* strains and physicochemical properties of their synthesized biosurfactants. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 177–186, 2011

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2008

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

CARRILLO, C. et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1611, n. 1-2, p. 91-97, 2003.

CHAKRABARTY, S. **Biossurfactante bacteriano: caracterização, propriedade antimicrobiana e na remediação de metais**. 2012. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências da vida). Instituto Nacional de Tecnologia. 2012.

CHANDANKERE, R. et al. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. **Biochemical Engineering Journal**, v. 74, p. 46–53, 2013.

COOKSEY, R. C.; BANNISTER, E. R.; FARRAR, W. E. J. Antibiotic resistance patterns of clinical isolates of *Serratia marcescens*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 7, n. 4, p. 396–399, abr. 1975.

COOPER, D. G. et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, 1981.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173–176, 1984.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COUTTE, F. et al. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 499–507, 2010.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnhnology: A Textbook of Industrial Microbiology**. Madison, Science Tech, Inc., cap. 5. 1984

- DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, 2007.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1675–1684, 2008.
- DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface - Implications for the effect of fengycin on biological membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2005.
- DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. **Biophysical Journal**, 2008.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47 LP-64, 1 mar. 1997.
- DOMINGOS, D. F. et al. Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 3155–3167, 2015.
- DUVNJAK, Z.; COOPER, D. G.; KOSARIC, N. Effect of nitrogen source on surfactant production by *Arthrobacter paraffines* ATCC 19558. Microbial enhanced oil recovery, p. 66-72, 1983.
- EDWARDS, J. R.; HAYASHI, J. A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 111, n. 2, p. 415-421, 1965
- EHRHARDT, D. D. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, SP, 2015.
- ELSHAFIE, A. E. et al. Production, Characterization, and Application of *Bacillus licheniformis* W16 Biosurfactant in Enhancing Oil Recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–14, 2016.
- FALATKO, D. M.; NOVAK, J. T. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. **Water environment research**, v. 64, n. 2, p. 163-169, 1992.
- FERNANDES, P. A. V. et al. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 704–709, 2007.
- FONTES, G.; AMARAL, P.; COELHO, M. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155–166, 2006.
- GEORGIU, G.; LIN, S.-C.; SHARMA, M. M. Surface-Active Compounds from Microorganisms. **Bio/Technology**, v. 10, p. 60, 1 jan. 1992.

GOMAA, E. Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain m104 grown on whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 259–268, 2013.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M. Bactérias produtoras de Biossurfactantes. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, jan/jun, p. 39-45, 2003.

GREEK, B. F. Detergent Industry Ponders Product for New Decade. **Chemical Engineering News**, v. 68, p. 37-38, 1990.

GUDIÑA, E. J. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 59, 2015

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 298–304, 2010.

HANANO, A.; SHABAN, M.; ALMOUSALLY, I. Biochemical, molecular, and transcriptional highlights of the biosynthesis of an effective biosurfactant produced by *Bacillus safensis* PHA3, a petroleum-dwelling bacteria. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

HATHA, A. A. M.; EDWARD, G.; PATTANATHU RAHMAN, K. S. M. Microbial Biosurfactants – Review. **J.Mar. Atmos. Res.**, v. 3, n. 2, p. 1–17, 2007.

HINGLEY, S. T. et al. Effect of ciliostatic factors and *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 254-262, 1986.

HOLDEN, J. How to select hazardous waste treatment technologies for soils and sludges. Pollution Technology Review 163 Noyes Data Corp., Park Ridge, N.J, 1989.

HU, Y.; JU, L. K. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 263–272, 2001.

HUA, Z. et al. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, 2003.

JEMIL, N. et al. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. **BMC Microbiology**, 2017.

JONES M.; COMER I.; CUNHA B. Tetracyclines. In: Raven H, editor. J. Antimicrobial Therapy, New York.. p. 219-234, 1996.

JOSHI, S. et al. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 195–199, 2008.

KARIKALAN, S.; MOHANKUMAR, A. Studies on ampicillin resistant plasmid of *Streptococcus mutans* isolated from dental caries patients. **Biotechnol Res Commun**, v. 9, n. 1, p. 151–156, 2016.

KRISHNASWAMY, M. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94 (6), n. 736–747, 2008.

KUME, G.; GALLOTTI, M.; NUNES, G. Review on anionic/cationic surfactant mixtures. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2008.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.

87–93, 2001.

MANO, M.C.R. **Estudo da Recuperação, Concentração e Purificação de Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis***. 2008. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, Campinas, SP.

MARAHIEL, M. A. et al. Biological Role of Gramicidin S in Spore Functions. **European Journal of Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 49–55, 1979.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation** **Trends in Biotechnology**, 2012.

MARIN, C. P. et al. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products**, 2015.

MCINERNEY, M. J.; JAVAHERI, M.; NAGLE, D. P. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 5, n. 2–3, p. 95–101, 1990.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2000.

MOUAFO, T. H.; MBAWALA, A.; NDJOUENKEU, R. Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* spp. **BioMed research international**, v. 2018, p. 5034783, 2018.

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

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; EFTEKHARI, F. Remediation with surfactant foam of PCP-contaminated soil. **Engineering Geology**, v. 70, n. 3–4, p. 269–279, 2003.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1–4, p. 371–380, 2001.

NDLOVU, T. et al. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1–2, p. 81–85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from

- Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, M. Biosurfatantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- OBERBREMER, A., MULLER-HURTIG, R., WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 32, 485–489, 1990.
- PATHAK, K. V et al. Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 23, n. 10, p. 1716–1728, 2012.
- RAMANA, K. V.; KARANTH, N. G. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. **Biotechnology letters**, v. 11, n. 6, p. 437-442, 1989.
- REIS, R. S. et al. Biosurfactants: Production and Applications. **Biodegradation - Life of Science**, v. 3, n. 4, 2013.
- RIND, R.; KHAN, T. S. Antibioqram sensitivity of bacterial organisms identified from surgical and non-surgical wounds of Animals. **Pak. J. Biol. Sci**, v. 3, n. 10, p. 1719–1723, 2000.
- RIVERA, O. M. P.; MOLDES, A. B.; TORRADO, A. M.; DOMINGUEZ J. M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1010-1020, 2007.
- ROSEN, M.. **J. Surfactants and Interfacial Phenomena**. Wiley, New York. 1978.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioemulsans: Microbial polymeric emulsifiers. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 313-316, 1997.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.
- SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005–1016, 2013.
- SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on Biosurfactatns, Current Developments and Perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. nov 2011, 2011.
- SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, n. 1, p. 1-14, 2012.
- SAMSON, R., CSEH, T., HAWARI, J., GREER, C.W., ZALOUM, R. Biotechnologies applique'es a' la restauration de sites contamine's avec d'application d'une technique physico chimique et biologique pour les sols contamine's par des BPC. **Science et Techniques del'Eau** 23, 15–18, 1990.
- SATPUTE, S. K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010.
- SELLAMI, M. et al. Agro-industrial waste based growth media optimization for biosurfactant

production by *Aneurinibacillus migulanus*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, 2016.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. **Progress in energy and combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 714–724, 2008.

SEYDLOVÁ, G. Surfactin - Novel Solutions for Global Issues. In: ČABALA, R. (Ed.). . Rijeka: IntechOpen, 2011. p. Ch. 13.

SHAO, C. et al. Structural diversity of the microbial surfactin derivatives from selective esterification approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1855–1872, 2015.

SHAVANDI, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 477–482, 2011.

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

SINGLA, R. K.; DUBEY, H. D.; DUBEY, A. K. Therapeutic Spectrum of Bacterial Metabolites Therapeutic Spectrum of Bacterial Metabolites. v. 2, n. 2, p. 52-64, 2014.

SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LEITE, L. F. C.; SARUBBO, L. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, 43: 912-917. 2008

SOTIROVA, A. V. et al. Rhamnolipid–biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Current microbiology**, v. 56, n. 6, p. 639-644, 2008.

SOUSA, M. et al. Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: Study of the phase behaviour of emulsified systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 613–623, 2014.

SRIRAM, M. I. et al. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 174–181, 2011

SUZUKI, T. et al. The Chemical Structure of Polymyxin E: The Identities of Polymyxin E₁ with Colistin A and of Polymyxin E₂ with Colistin B. **The Journal of Biochemistry**, v. 57, n. 2, p. 226–227, 1965.

THAVASI, R. et al. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 686–691, 2007.

THIMON, L. et al. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n. 2, p. 101–106, 1995.

TRAN, J. Enhanced oil recovery. Disponível em: <https://www.studentenergy.org/topics/enhanced-oil-recovery>. Acesso em: 01 out. 2018

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants.

Biotechnology Advances, v. 9, n. 2, p. 241–252, 1991.

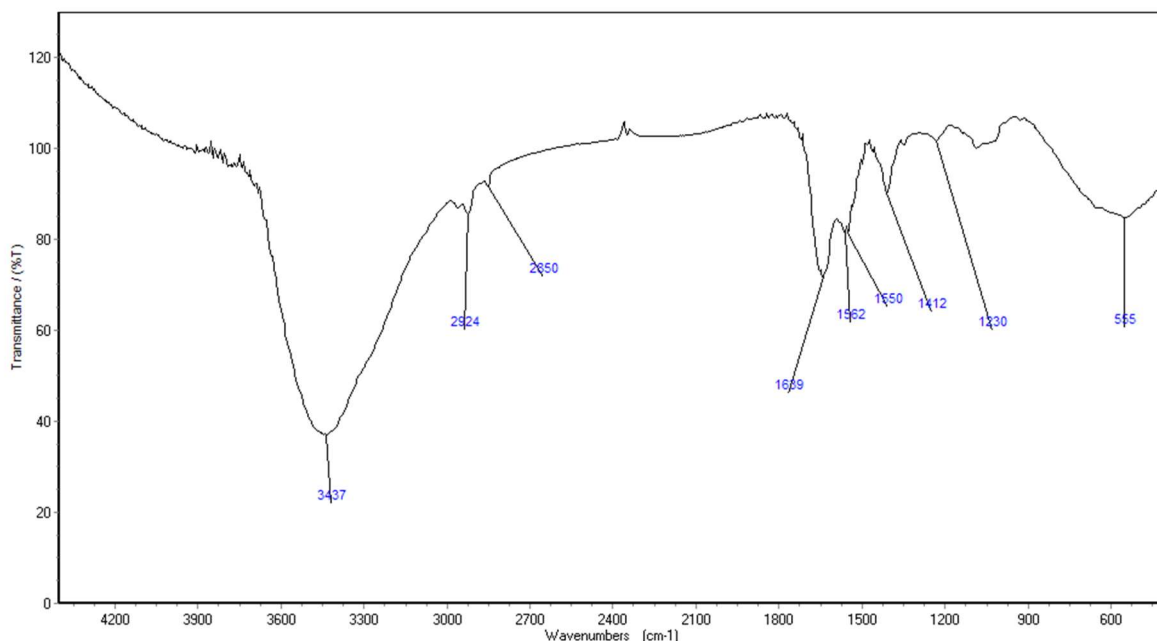
VIJAYAKUMA, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 181–192, 2015.

WEST, C. C.; HARWELL, J. H. Surfactants and subsurface remediation. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 12, p. 2324–2330, 1 dez. 1992.

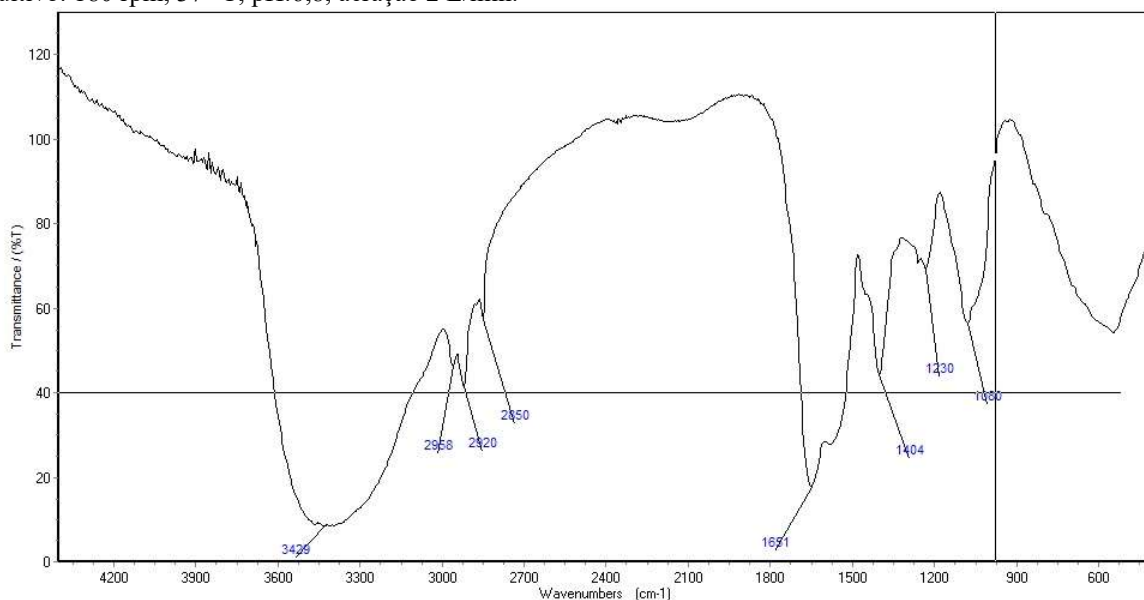
ZANIN, G. M.; NEITZEL, I.; MACHADO, N. R. Laboratório de Engenharia Química III – *Notas de aula*. 51f. Apostila – Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Maringá, Maringá. 1998.

APÊNDICE

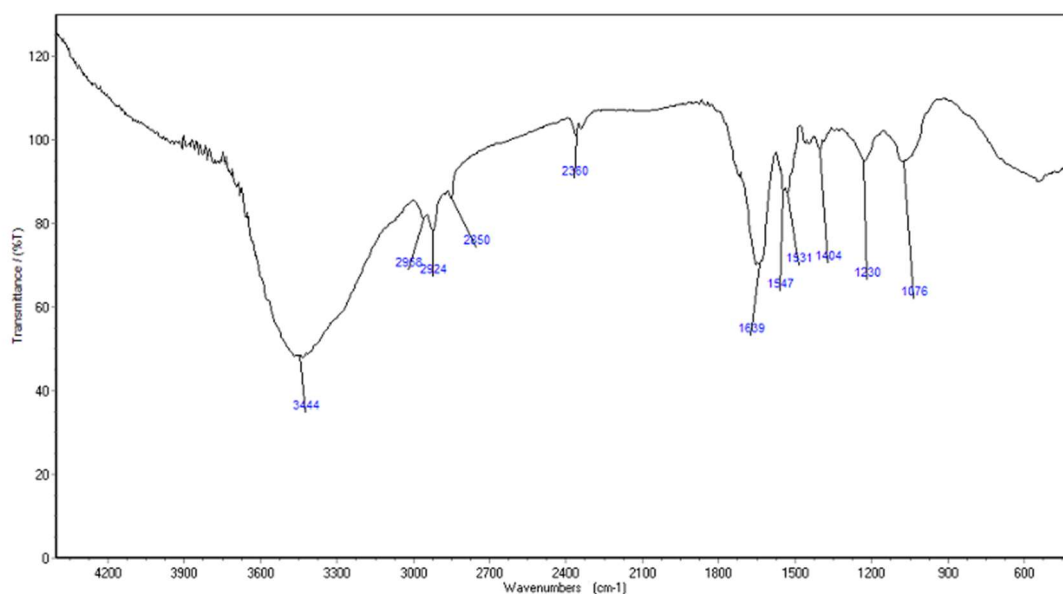
APÊNDICE A – Espectrograma de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de todos os experimentos em biorreator.



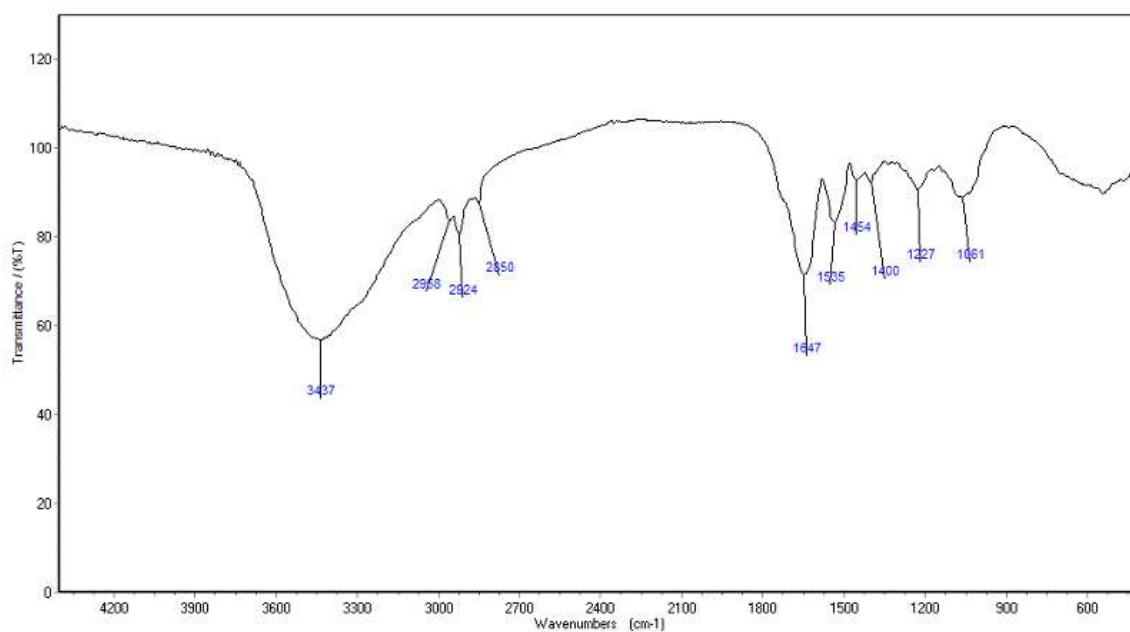
Espectrograma de infravermelho (FTIR) do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565, realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator utilizando *Bacillus safensis* (EB12), a partir de melão de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min.



Espectrograma de infravermelho (FTIR) do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565, realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator utilizando *Bacillus safensis* (EB13) com pH ajustado (7,0) após precipitação ácida, a partir de melão de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min.



Espectrograma de infravermelho (FTIR) do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565, realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator utilizando *Bacillus safensis* (EB14), a partir de melaço de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min.



Espectrograma de infravermelho (FTIR) do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565, realizado através da espuma produzida a partir do produto do processo em biorreator utilizando *Bacillus safensis* (EB22), a partir de melaço de cana-de-açúcar como substrato e extrato de levedura (1 % - p/v). Condições do cultivo: 180 rpm, 37 °C, pH:6,8, aeração 2 L/min.