

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CAROLINA ZANINI OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus* EM MEIO COM
CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

JOÃO PESSOA – PB

2021

CAROLINA ZANINI OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus* EM MEIO COM
CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**JOÃO PESSOA – PB
2021**

CAROLINA ZANINI OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *Bacillus* EM MEIO COM CALDO DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa

JOÃO PESSOA – PB

2021

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

048p Oliveira, Carolina Zanini.

Produção de biossurfactantes por *Bacillus* em meio com
caldo de cana-de-açúcar / Carolina Zanini Oliveira. -
João Pessoa, 2021.

90 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo Santos.

Coorientação: Carlos Alberto Bispo de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Engenharia química. 2. Biossurfactante. 3. *Bacillus*.
4. Caldo de cana-de-açúcar. 5. Óleo de abacate. 6.
Bioemulsificantes. 7. Tensão superficial. I. Santos,
Sharline Florentino de Melo. II. Sousa, Carlos Alberto
Bispo de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 66.0(043)

CAROLINA ZANINI OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *Bacillus* EM MEIO COM CALDO DE
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: 28.07.2021

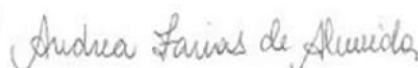
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB
(Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa – DEQ/CT/UFPB
(Coorientador)



Prof^a. Dr^a. Andrea Farias de Almeida – DB/CBIOTEC/UFPB
(Avaliadora interna)



Prof^a. Dr^a. Laís Campos Teixeira de Carvalho-Gonçalves – DTS/CTDR/UFPB
(Avaliadora externa)

A minha família e amigos,
dedico de todo o meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado tantos anjos no meu caminho e ter me sustentado até aqui nos momentos em que mais precisei de luz e discernimento.

A minha família, em especial minha mãe que me aconselhou e me amparou em todos os momentos e sempre vibrou com todas as minhas conquistas. A felicidade advinda da conclusão deste trabalho também é sua, mãe! Eu te amo.

Ao meu maravilhoso namorado Eduardo que, apesar de não ter acompanhado toda a trajetória deste trabalho, esteve presente nos últimos meses sempre me apoiando e incentivando com toda paciência desse mundo. A você, meu amor, meus mais sinceros agradecimentos!

A todos os meus amigos que tanto me deram colo e foram os meus anjos, esse trabalho também tem um pouco de vocês! Em especial Pedro, Pepe, Nayara e Deise que foram companhia nos muitos dias de experimento sempre deixando tudo mais leve com tantas risadas. Amo vocês demais e me fazem muita falta!

Aos amigos que fiz no mestrado, em especial Felipe, Riann e Elder, que foram meus companheiros de laboratório a quem tenho grande admiração e amor imenso, ter vocês durante todo o mestrado fez tudo valer a pena, agradeço pela companhia, ajuda, amor e amizade a mim dedicados. Também a Paloma e César por tanta ajuda com as minhas dúvidas em muitos momentos e pela companhia no laboratório vocês foram anjos!

Aos amigos que levei da graduação pra vida e que me acompanharam e me auxiliaram sempre me dando animo e ombro pra continuar, principalmente Leanderson que sempre teve uma paciência imensa e conseguia levar tudo com bom humor, obrigada por tudo!

A todos que fazem parte do LaBio, fui muito feliz nesse laboratório e sou muito grata por todo o aprendizado.

Aos meus queridos orientadores, Sharline e Bispo, que são meus grandes exemplos de profissionais a quem tenho imensa admiração e carinho, sem a orientação de vocês essa pesquisa não seria possível.

A minha banca, Andrea Farias e Laís Campos por toda contribuição com as sugestões a esta pesquisa, meus sinceros agradecimentos por todo conhecimento compartilhado.

Aos professores e técnicos da UFPB que contribuíram de alguma forma com este trabalho, em especial professora Ana Flávia que sempre esteve disposta a auxiliar com as dúvidas e experimentos.

A Dennys do Laboratório de Tecnologia de Tenssoativos e Processos de Separação da UFRN que foi um anjo e me estendeu a mão sem nem me conhecer direito abrindo seu laboratório e compartilhando seu vasto conhecimento na área de tenssoativos me auxiliando nas análises e na pesquisa em diversos momentos. Obrigada de coração por tudo! Agradeço também a Gilmar técnico do laboratório de Engenharia Ambiental e Controle de Qualidade da UFRN que me auxiliou nas análises iniciais de tensão superficial desta pesquisa e sempre foi muito solícito.

A Bárbara, doutoranda da UFPE, que também foi um anjo no meu caminho aparecendo na minha vida durante as análises no período da pandemia e foi uma companhia no laboratório me ajudando também a conseguir um tensiômetro para realizar as análises finais desta pesquisa. À Karen, também doutoranda da UFPE que se dispôs a ajudar com as análises de tensão superficial e tirou algumas dúvidas sobre o tema deste trabalho. Meninas vocês foram muito importantes!

A FAPESQ e à UFPB pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“Per aspera ad astra” – Através
das adversidades para as estrelas.*

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas de estrutura análoga aos surfactantes obtidos por via química, possuem a capacidade de misturar fases de polaridades distintas formando agregados moleculares ou micelas e são adequados para diversas aplicações industriais. A limitação da produção industrial e a comercialização em grande escala dos biossurfactantes é devido aos elevados custos dos substratos utilizados para sua produção, podendo chegar até 30% do custo total. O presente trabalho teve por objetivo produzir biossurfactantes em meios contendo substratos de origem regional como indutores utilizando cepas de *Bacillus subtilis* UFPEDA 16, *B. subtilis* UFPEDA 86 e *B. pumilus* e, posteriormente, avaliar os compostos obtidos quanto a sua estabilidade em termos de temperatura, pH e salinidade. Inicialmente foram realizados testes para avaliar a produção em meios contendo caldo de cana e óleo de abacate ou óleo de soja residual. Os experimentos foram realizados utilizando as três cepas de *Bacillus* e analisadas quanto ao índice de emulsificação em óleo vegetal a cada 24h, totalizando 96h de cultivo. As três cepas produziram bons emulsificantes, com destaque para *Bacillus pumilus* que mostrou capacidade de emulsionar até $66,19 \pm 0,67\%$ em 48h de cultivo. Após a etapa de seleção foi realizado o ensaio cinético das cepas que apresentaram melhores resultados. Na cinética de crescimento foi observado que a adição do óleo de abacate favoreceu mais o crescimento de ambas as cepas de *Bacillus* quando comparado ao meio contendo apenas caldo de cana como fonte de carbono. Na análise da produção de biossurfactante, o meio contendo óleo de abacate favoreceu uma maior produção do biossurfactante utilizando a cepa *B. pumilus* apresentando um alto percentual de emulsificação de $51,09 \pm 4,24\%$ e *B. subtilis* UFPEDA 16 com $49,98 \pm 2,10\%$ com 24h de fermentação. Para os resultados de tensão, os maiores percentuais de redução foram obtidos nos meios sem a utilização do óleo com 29,21% em 24h para *B. subtilis* 16 e 28,89% em 12h para *B. pumilus*. O sistema de cortes (produção semi-continua) na produção de biossurfactantes foi utilizado visando um possível aumento para escala industrial. Os experimentos foram conduzidos em três diferentes percentuais de cortes de 40%, 60% e 80% avaliados quanto a capacidade de formação do bioproduto ao longo do processo fermentativo. A quantidade de bioproduto obtida apresentou em 48h valor máximo de $5,76 \pm 0,56$ g/L no corte de 40%. O maior percentual de emulsificação obtido foi de $52,70 \pm 4,50\%$ no primeiro corte de 60%, nos demais cortes observa-se valores semelhantes de $49,22 \pm 2,91\%$ e $45,28 \pm 1,39\%$ nas amostras de 40% e 60%, respectivamente, no tempo de 48h. Nos ensaios de estabilidade os testes realizados com óleo de algodão indicaram boa tolerância a faixa de pH 2 a 10, 0,5 a 10% de salinidade, temperaturas de 40 a 100° C e capacidade de manter emulsões estáveis durante o tempo de 96h. Todos os resultados obtidos nos meios propostos foram considerados satisfatórios para possível aplicação nos diversos setores industriais.

Palavras-chave: Biossurfactante; *Bacillus*; caldo de cana-de-açúcar; óleo de abacate; bioemulsificantes; tensão superficial

ABSTRACT

Biosurfactants are molecules with a structure similar to chemically obtained surfactants, having the ability to mix phases of different polarities forming molecular aggregates or micelles and are also suitable for various industrial applications. The limitation of industrial production and large-scale commercialization of biosurfactants is due to the high cost of the substrates used for their production, which can reach up to 30% of the total cost. Thus, the search for a cost reduction strategy becomes essential to make production less expensive. The present work aims to produce a biosurfactant in media containing substrates of regional origin as inducers, using strains of *Bacillus subtilis* UFPEDA 16, *B. subtilis* UFPEDA 86 and *B. pumilus* and, subsequently, evaluate the compounds obtained for their stability and viability of use. Initially, tests were carried out to select the media containing sugarcane juice and avocado oil and sugarcane juice and residual oil. The cultures were tested using the three *Bacillus* strains and analyzed for the index of emulsification in vegetable oil every 24h, for a total of 96h of fermentation. The three strains produced good emulsifiers, with emphasis on *B. pumilus*, which showed the ability to emulsify up to $66.19 \pm 0.67\%$ in 48 h the media with avocado oil and residual oil. After the selection step, the kinetic assay of the strains that showed the best results was performed. In the growth kinetics, it was observed that the addition of avocado oil favored the growth of both *Bacillus* strains when compared to the medium containing only sugarcane juice as a carbon source. In the analysis of the biosurfactant production, the medium containing avocado oil favored its production, being possible to reach percentages of emulsification of $51.09 \pm 4.24\%$ for the *B. pumilus* strain and $49.98 \pm 2.10\%$ for the strain *B. subtilis* UFPEDA 16, both within 24 h of fermentation. For the strain results, the highest reduction percentages were obtained in the media without the use of oil with 29.21%, in 24 h, for *B. subtilis* UFPEDA 16 and 28.89%, in 12h, for *B. pumilus*. The cutting system (semi-continuous production) in the production of biosurfactants was used aiming at a possible increase to industrial scale. The experiments were carried out in three different percentages of cuts (40, 60 and 80%) and evaluated for the capacity of bioproduct formation during the fermentation process. The highest amount of bioproduct obtained was 5.76 ± 0.56 g/L, in 48 h and at 40% cut. The highest percentage of emulsification obtained was $52.70 \pm 4.50\%$ in the first cut of 60%. In the other cuts, values of $49.22 \pm 2.91\%$ and $45.28 \pm 1.39\%$ were observed in the samples of 40% and 60%, respectively, in the period of 48h. In the stability tests, the trials carried out with cottonseed oil indicated good tolerance to the pH range from 2 to 10, different percentages of NaCl, high temperatures and the ability to maintain stable emulsions over a period of 96 h. All results obtained in the proposed means were considered satisfactory for possible application in various industrial sectors.

Keywords: biosurfactant; *Bacillus*; sugar cane juice; avocado oil; bioemulsifiers; superficial tension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1	Caldo de cana e óleo de abacate utilizado na composição dos meios	36
Figura 4.2	Microrganismos utilizados na produção do biossurfactante	37
Figura 4.3	Produção de biossurfactante utilizando meios com e sem adição de óleo de abacate.	39
Figura 4.4	Tensiômetro sigma 700 realizando leitura de tensão superficial	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos na sua produção	21
Tabela 3.2	Descrição de características e vantagens dos biossurfactantes	23
Tabela 3.3	Funções e aplicações industriais dos biossurfactantes	24
Tabela 3.4	Tipos de processos utilizados para extração de biossurfactante	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. BIOSSURFACTANTES: BREVE HISTÓRICO E DEFINIÇÃO	19
3.1.1 Classificação	20
3.1.2 Vantagens dos biossurfactantes.....	22
3.1.3 Aplicação dos biossurfactantes.....	23
3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES	26
3.2.1 Gênero <i>Bacillus</i>	27
3.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	29
3.4. UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS INDUTORES.....	32
3.4.1 Caldo de cana de açúcar	33
3.4.2 Óleo de abacate.....	33
3.4.3 Óleo residual de soja	34
4 METODOLOGIA	36
4.1 OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS	36
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	37
4.3 MICRORGANISMOS.....	37
4.4 SELEÇÃO DOS SUBSTRATOS INDUTORES	38
4.5 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	38
4.6 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	38
4.7 ANÁLISES	40
4.7.1 Determinação do crescimento celular	40
4.7.2 Determinação do pH e açúcares redutores totais.....	40

4.7.3 Índice de emulsificação e atividade emulsificante	40
4.7.4 Tensão superficial.....	42
4.8 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO	42
4.8.1 Produtividade em biomassa	42
4.8.2 Velocidade específica de crescimento máxima	43
4.8.3 Tempo de Geração.....	43
4.8.4 Fator de conversão de substrato em biomassa	43
4.9 SEPARAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE	44
4.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	44
4.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE.....	44
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 ARTIGO 1: SELEÇÃO DE INDUTORES E CEPAS DE <i>Bacillus</i> PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	47
5.2 ARTIGO 2: USO DE ÓLEO DE ABACATE NO MEIO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR DUAS CEPAS DE <i>Bacillus</i>	54
5.3 ARTIGO 3: PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR PROCESSO SEMICONTÍNUO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS BIOMOLÉCULAS.	66
6 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas de superfície ativa, que apresentam duas porções, uma hidrofílica e outra hidrofóbica. Estes compostos possuem propriedades de reduzir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos ou entre uma fase líquida e uma fase sólida. Possuem a capacidade de misturar fases de polaridades distintas formando agregados moleculares ou micelas, tornando-se adequados para as aplicações industriais que abrangem as propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, solubilização e dispersão de fases (SILVA, 2017; FERNANDES et al., 2017). Os surfactantes são classificados em dois grupos: sintético e surfactante natural (SHARMA et al., 2017).

Os surfactantes sintéticos são derivados do petróleo, por essa razão passam anos para se degradarem na natureza, são tóxicos e liberam compostos contaminantes no ambiente prejudiciais à saúde. O risco de acidentes em áreas onde há movimentação de hidrocarbonetos em larga escala aumenta à medida que tais atividades são realizadas. Esses perigos alertam para a produção de surfactantes de origem microbiana, também conhecidos como biossurfactantes (ZHENG et al.2012; SILVA et al.2014).

Devido a ampla utilização de compostos tensoativos pela indústria, a comercialização de biossurfactantes tem apresentado tendência de crescimento diante do seu grande potencial de utilização e desenvolvimento. Segundo Vieira et al. (2021) o mercado mundial para biossurfactantes foi de 4,20 bilhões de dólares em 2017, esse mercado tem possibilidade de atingir a marca dos 5,52 bilhões de dólares em 2022, devido principalmente a maior demanda por esse bioproduto ser a do setor de saneantes. Essa informação esta fortemente atrelada as questões da pandemia desencadeada pelo coronavírus SARS-CoV-2, que abriu espaço para uma possibilidade ainda maior de expansão do valor de mercado desses compostos, que pode até exceder os valores estimados, pois a mudança de comportamento em todo mundo atrelada as questões de higiene favoreceram um maior uso de produtos deste segmento em todo o mundo. Empresas do setor químico têm demonstrado interesse no desenvolvimento e comercialização de biossurfactantes, aumentando também o número de patentes relacionadas ao mesmo.

Os biossurfactantes podem ser obtidos por várias fontes e sintetizados a partir de bactérias, fungos e leveduras. Por essa razão possuem diferentes estruturas químicas e propriedades particulares (MARTINS e MARTINS, 2018). Sua qualidade é diretamente influenciada pela fonte de carbono, concentrações de nutrientes, tais como, nitrogênio,

fósforo, magnésio, ferro, enxofre e manganês no meio e as condições de crescimento, tais como pH, temperatura, agitação e concentração de oxigênio disponível. São caracterizados como moléculas biotensoativas que se comportam de maneira análoga aos surfactantes sintéticos, diminuindo a tensão superficial e interfacial e estabilizando as soluções pela formação de microemulsões com a vantagem de serem biodegradáveis, com baixa toxicidade e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (PEREIRA et al., 2013; MORAIS et al., 2015).

Entre os microrganismos produtores de biosurfactantes, os do gênero *Bacillus* são amplamente estudados. Geralmente são produtores de lipopeptídeos, que podem ser iturinas, fengicinas, liquenisinas e surfactinas. As surfactinas, mais comumente produzidas pelos *Bacillus subtilis*, são conhecidas como um biotensoativo de alta eficiência no que diz respeito a redução de tensão superficial e possuem uma ampla aplicabilidade na indústria, desde biorremediação a produtos farmacêuticos e são classificadas como GRAS (*generally regarded as safe*), logo, é segura para o homem e para animais, assim como os metabólitos produzidos por elas.

A limitação da produção industrial e a comercialização em grande escala dos biosurfactantes é devido aos elevados custo dos substratos utilizados para produção, podendo levar até 30% do custo total. Os substratos agroindustriais são de baixo custo e contêm elevados níveis de carboidratos ou de lipídeos que suprem a necessidade de fonte de carbono para a produção de biosurfactantes (ROVINA, EHRHARDT e TAMBOURGI, 2018).

As fontes de carbono e os processos de produção utilizadas para produção de biosurfactantes influenciam no rendimento, quantidade, qualidade e características físico-químicas do bioproduto formado. Portanto, a escolha da fonte de carbono é de grande importância para o processo de fermentação. Microrganismos produtores podem usar vários compostos como fontes de carbono e energia, com destaque para três tipos: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos e gorduras (NURFARAHIN, MOHAMED e PHANG, 2018; JAIN et al., 2013). Por essa razão neste estudo foram escolhidos o caldo-de-cana, como constituinte principal do meio de cultivo, que é um produto agroindustrial obtido através da moagem da cana de açúcar e possui baixo custo sendo amplamente utilizado em bioprocessos. Também foram escolhidos dois tipos de óleo, abacate e residual de fritura, o primeiro por não apresentar estudos com sua utilização e o segundo por apresentar uma alternativa a reaproveitamento de resíduos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de biossurfactantes, por cepas de *Bacillus*, utilizando diferentes substratos indutores, e realizar a caracterização parcial dessas biomoléculas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização físico-química do caldo de cana;
- Avaliar diferentes substratos indutores na composição de meios e a utilização de três cepas de *Bacillus* quanto à produção de biossurfactantes;
- Estudar a cinética de crescimento celular e produção do biossurfactantes na melhor condição encontrada;
- Avaliar a produção de biossurfactante por processo semicontínuo (sistema de corte);
- Realizar a purificação parcial dos biossurfactantes;
- Realizar testes de atividade antimicrobiana;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactantes obtido em relação à temperatura, pH e salinidade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOSSURFACTANTES: BREVE HISTÓRICO E DEFINIÇÃO

Em 1965, leis de proteção ambiental foram criadas a fim de limitar a utilização de polímeros de propeno ramificados, na fabricação de tensoativos, diante da observação dos primeiros problemas ambientais ocasionados pelo uso dos detergentes que eram constituídos por polímeros derivados de hidrocarbonetos, base de surfactantes sintéticos. Diante da baixa degradabilidade destes componentes químicos, as indústrias produtoras tiveram que se adaptar as novas matérias-primas com uma melhor degradação gerando produtos menos nocivos ao meio ambiente, como os polímeros lineares de propeno e o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) (ROBERTO, 2000; DALTIM, 2011).

Com o passar dos anos, a sofisticação e criação de novos produtos de higiene pessoal, bem como produtos de limpeza foram empregando em suas formulações diferentes surfactantes sintéticos, por essa razão houve um apelo por processos industriais e produtos sustentáveis e fez com que a busca por substituintes aos tensoativos sintéticos de origem petroquímica ganhasse destaque (DALTIM, 2011).

Descobertos no final da década de 1960, em um processo fermentativo usando petróleo como matéria base, os biossurfactantes atraíram muita atenção devido as inúmeras vantagens sobre os surfactantes químicos (KITAMOTO; TOMA; HATO, 2005). Por possuírem facilidade de se degradar na água e no solo, e, portanto, podendo ser aplicados em processos de biorremediação e tratamentos residuais, além de possuírem aplicabilidade nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (FERREIRA *et al.*, 2017; NITSCHKE E PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são tensoativos microbianos que possuem estruturas semelhantes aos surfactantes sintéticos: são polímeros constituídos de moléculas anfipáticas contendo porções polares e apolares ao longo de sua cadeia formando micelas, que são estruturas globulares, que se depositam na interface entre líquidos de polaridades distintas diminuindo a área de contato entre cadeias hidrocarbônicas e a água, facilitando assim a formação de microemulsões. A porção hidrofílica dessas biomoléculas é composta por carboidratos, aminoácidos, ácido carboxílico, álcool, fosfato, ou por um peptídeo cíclico e sua porção hidrofóbica é constituída de ácido graxos de cadeia longa, ou de hidroxíácidos (NITSCHKE e PASTORE, 2002; SOARES, 2014).

3.1.1 Classificação

Os biossurfactantes podem ser classificados de duas formas mais gerais, primeira geração e de segunda geração. Os classificados como primeira geração, também chamados de “surfactantes verdes”, são entendidos como compostos produzidos por meio de sínteses químicas a partir de recursos renováveis ou extraídos de matérias-primas vegetais e animais. Seus representantes são as saponinas, ésteres de açúcares, alquilpoliglicosídeos e alcanolamidas. Em contrapartida, biossurfactantes de segunda geração são produzidos inteiramente a partir de reaproveitamento por um processo biológico, como biocatálise ou fermentação (ALBANO, 2014; SOETAERT, 2014). São exemplos de biotensioativos de segunda geração produzidos por microrganismos os que estão descritos na Tabela 3.1.

Os glicolipídios podem ser classificados em mono, di, tri e tetrassacáridos que incluem a glicose, manose, galactose, ácido glucurônico e sulfato de galactose. Os lipídios ligados a açúcares, como os trealoselipídeos, ramnolipídeos e soforolipídeos estão envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade por microrganismos. Os ramnolipídios se apresentam como uma atrativa classe de biossurfactantes, pois podem ser produzidos em meios de cultivo contendo tanto hidrocarbonetos quanto carboidratos como única fonte de carbono e são os glicolipídios mais bem estudados e capazes de reduzir a tensão superficial, emulsificar hidrocarbonetos e estimular o crescimento de *P. aeruginosa* em n-hexadecano (SILVA, 2016).

A surfactina é um lipopeptídeo produzido pelo gênero *Bacillus* sp., contendo uma cadeia de treze a quinze átomos de carbono. Sua estrutura é composta por uma série de aminoácidos, dentre eles a L-Asparagina, L-Leucina, L-Glicina, L-Leucina, L-Valina e duas D-Leucinas. Este lipopeptídeo foi caracterizado como um dos biossurfactantes de maior eficiência, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 a 27 mN.m⁻¹ em concentrações tão baixas como 0.005% e conforme experimentos já realizados com ratos apresenta baixa toxicidade (RAHMAN, GAKPE, 2008; SHALIGRAM & SINGHAL 2010).

Fosfolipídios, ácidos graxos e lipídeos neutros são produzidos em grande quantidade por diversas bactérias e leveduras durante o crescimento em n-alcenos (DESAI, BANAT, 1997). Os ácidos graxos originados de alcanos se destacam como agentes tensoativos devido ao equilíbrio hidrofílico / lipofílico relacionado ao comprimento da cadeia de hidrocarboneto. No que diz respeito a diminuir as tensões superfícies e interfaciais, os ácidos graxos saturados mais ativos estão na faixa de $\pm$ C12 C14. Além de ácidos graxos de cadeia linear, microrganismos produzem ácidos graxos complexos que contêm grupos

hidroxila e ramos alquila. Os fosfolipídios são componentes principais da membrana microbiana, dessa forma quando certas bactérias ou leveduras responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos são cultivadas em substratos contendo alcanos o nível de fosfolipídios tende a aumentar de forma considerável (ROSENBERG et al., 1999).

Tabela 3.1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos na sua produção.

Tipos de Biossurfactantes	Microrganismo
Glicolipídeos	
- rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i> , <i>T. candida</i>
- trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- surfactina	<i>Bacillus sp.</i>
- subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Fosfolipídeos, Ácidos graxos e lipídeos neutros	
- ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte: Nitschke e Pastore (2002)

Biossurfactantes poliméricos possuem em sua composição carboidratos, proteínas, lipídios e a mistura desses compostos (MAIER, 2003). Tais biotensioativos viabilizam a formação de emulsões estáveis devido a sua alta afinidade por interfaces óleo/água (VALPUESTA, 2008). Os biossurfactantes poliméricos mais estudados são o emulsan e

liposan. Emulsan consiste em um eficaz agente emulsificante para hidrocarbonetos em água e é produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* (DESAI e BANAT, 1997). A levedura *Candida lipolytica* é conhecida como produtora do bioemulsificante liposan (BANAT et al., 2010; RUFINO et al., 2014).

Os biotensoativos também podem ser classificados por sua atuação na perturbação do equilíbrio de duas fases químicas podendo ser: aniônicos, não-iônicos, catiônicos e anfóteros (GAJEWSKI, 2017). Aniônicos são agentes constituídos de um ou mais grupos funcionais e um radical com carga negativa que se ionizam em solução aquosa e liberam íons orgânicos carregados. Os representantes comuns deste grupo são os sabões, compostos sulfonados e sulfatados.

Não-iônico são agentes anfifílicos obtidos a partir de álcoois de cadeia longa ou fenóis alquilados que possuem cargas pouco influentes no meio, de modo a não ionizar soluções aquosas portanto, caracterizando reação neutra. Interagem bem com compostos lipossolúveis e hidrossolúveis. Seus compostos conhecidos são polissorbato, ésteres de álcoois, ésteres de sorbitano e poliglicóis.

Catiônicos possuem em sua formação um ou mais grupamentos funcionais de carga positiva. Liberam íons orgânicos carregados positivamente quando em meio aquoso e produzem emulsões estáveis utilizando substratos renováveis. Anfóteros têm a capacidade de apresentar características aniônicas ou catiônicas e são estáveis em meio neutro interagindo em soluções aquosas de acordo com as condições de pH (SANTOS, SILVA, COSTA, 2016).

3.1.2 Vantagens dos biossurfactantes

A busca cada vez maior por processos industriais e produtos sustentáveis fez com que diversas indústrias mostrassem um interesse maior por substituintes aos tensoativos sintéticos de originários da petroquímica. Dessa forma, os biossurfactantes passaram a ter cada vez espaço e serem estudados e aplicados nos mais diversos processos e formulações, devido a possibilidade de serem obtidos a partir de matérias primas renováveis e apresentarem características que podem ser classificados como ecologicamente corretos (MAKKAR, CAMEOTRA, 2002; DALTIM, 2011; MAKKAR, CAMEOTRA, IBRAHIM, 2011).

Quando comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam algumas características e vantagens, como as descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Descrição de características e vantagens dos biossurfactantes.

Característica	Vantagem
Baixa toxicidade	Não causam danos aos seres vivos, podendo ser empregados sem restrições em alimentos e produtos farmacêuticos e cosméticos
Biodegradabilidade	São facilmente degradados na água e no solo, o que os tornam adequados para aplicações em biorremediação e tratamento de resíduos, bem como, os caracterizam como compostos ecologicamente corretos
Tolerância a temperatura, pH e força iônica extremos	Permite uma aplicação mais abrangente já que podem ser utilizados em condições drásticas de temperatura, pH e força iônica
Apresentam concentrações micelares críticas (CMC) baixas e alta atividade Surfactante	São mais eficientes e efetivos que, por exemplo, os sulfonatos aniônicos, uma vez que reduzem a tensão superficial mais rapidamente do que estes
Aumentam a adsorção na interface óleo-água aumentando a estabilidade das cadeias em uma única fase	A grande área interfacial coberta pela molécula adsorvida e a multiplicidade de pontos de ancoragem asseguram que não ocorra dessorção durante a colisão das partículas e aumentam grandemente a estabilidade das emulsões.
Possuem atividade biológica, tais como, antimicrobiana e antitumorais.	Podendo ser utilizados na indústria farmacêutica.
Podem ser produzidos a partir de substratos renováveis, tais como, efluentes agroindustriais e subprodutos da indústria petrolífera e alimentícia.	Estudos demonstram que subprodutos derivados da indústria petroquímica passam mais tempo para serem degradados no meio ambiente e estão associados a efeitos tóxicos.

Fonte: Guiotti (2018)

3.1.3 Aplicação dos biossurfactantes

Diante do que foi exposto sobre os biossurfactantes, é possível afirmar que tais compostos possuem inúmeras aplicações devido a sua adaptação a condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Diversos setores industriais, em especial os de atividade petrolífera, tem grande interesse na utilização de biotensoativos em substituição aos tensoativos sintéticos. Na Tabela 3.3 estão descritos algumas funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.

Tabela 3.3 - Funções e aplicações industriais dos biossurfactantes

Função do biossurfactante	Aplicação industrial
Recuperação de óleo residual, redução da viscosidade de óleos	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica
Solubilização	Alimentícia, cosmética, farmacêutica, papel, plásticos e têxtil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética, petrolífera, plásticos, curtumes, biorremediação e têxtil
Detergente e formadores de espuma	Curtumes, produtos para agricultura, indústria química e metalúrgica
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizantes	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizante	Têxtil
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação e tratamento de Resíduos
Removedor de ceras de frutas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto à areia de cascalho	Construção civil
Formadores de vesículas	Cosméticos e farmacêutico

Fonte: Adaptado de Antunes (2010) e Bugay (2009)

A aplicação mais significativa de biossurfactantes foi estudada em biorremediação, devido a problemas ocasionados principalmente pelo derramamento de petróleo e a contaminação por tensoativos sintéticos (KOSARIC et al., 1987; FRANZETTI et al., 2010; ASCI et al., 2010).

No que diz respeito a biorremediação de hidrocarbonetos, biossurfactantes e bioemulsificantes podem agir por dois mecanismos, o aumento a biodisponibilidade do substrato para microrganismos e a interação com a superfície celular, reduzindo as tensões interfaciais que aumenta a hidrofobicidade da superfície, permitindo substratos hidrofóbicos se associarem mais facilmente com as células bacterianas (MULLIGAN e GIBBS, 2004; SHEKHAR et al., 2014).

Obayori et al. (2009) investigaram as propriedades biodegradáveis do biossurfactante produzido por *Pseudomonas sp.* e Kang et al. (2010) utilizaram o soforolipídios em estudos de biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em petróleo iraniano, cru em condições de laboratório. Este biossurfactante também aumenta a biodegradação dos hidrocarbonetos derramados no solo, testados com a taxa de degradação variando de 85% a 97% da quantidade total. Tais resultados indicam que os soforolipídios tem potencial para facilitar a biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos com limitada solubilidade em água e aumentam a biodisponibilidade microbiana para biodegradação.

Os biossurfactantes também se mostram eficientes na biorremediação de metais pesados, que tendem a ser fortemente absorvidos na matriz de solos e sedimentos, limitando sua solubilidade e dificultando a sua remoção subsequente (BIONE, 2019). O método de lavagem com biossurfactantes aumenta a dessorção de metais em solos e sedimentos, biodisponibilizando os poluentes para a captação microbiana, que são degradados em produtos que não agredem o meio ambiente (ANISZEWSKI et al., 2010; BANAT et al., 2010; AÇIKEL 2011).

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

Os biossurfactantes são utilizados na agricultura principalmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Estas formulações apresentam compostos ativos geralmente hidrofóbicos, utilizando-se de agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas (LIN, 1996). Outro nicho de ação dos biossurfactantes compreendem os estudos desenvolvidos por Mnif et al. (2015), que demonstram a surfactina, como um biotensoativo com propriedades antifúngicas podendo ser utilizado de fungicida natural no combate contra fungos que infestam plantações, o que se torna mais adequado dentro da recente demanda por gestões de pragas e ecologicamente corretos. Sachdev e Cameotra (2013), descrevem os muitos benefícios gerados nas lavouras quando existe a simbiose entre rizobactérias produtores de biossurfactantes às raízes de plantas.

Os biotensoativos produzidos por essas bactérias aumentam a disponibilidade de moléculas hidrofóbicas que servem como nutrientes para a planta, facilitando assim assimilação desse recurso e também proporcionam uma maior molhabilidade do solo o que promove uma distribuição adequada de fertilizantes químicos no solo e contribuindo para o desenvolvimento do vegetal.

Na indústria alimentícia, os biossurfactantes possuem grande interesse como aditivo alimentício, contribuindo com numerosos papéis funcionais, por exemplo equilibrando as variações na qualidade das farinhas e consequentemente a estabilidade das massas, melhorando a consistência dos ingredientes promovendo o volume de pães e bolos, preservando o frescor e as características sensoriais, acelerando a velocidade de

transformação promovendo aeração e aumentando o rendimento dos processos, diminuir o consumo de ovos e gorduras e aumentar a vida de prateleira dos produtos, bem como melhorar a textura e cremosidade de produtos lácteos (CASTRO et al., 2012; NETA et al., 2012; FIB, 2013; CAMPOS et al., 2015).

3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES

Uma das mais importantes características dos surfactantes de origem biológica é que cada microrganismo, em diferentes condições de cultura e processos, pode produzir diferentes compostos, com diferentes estruturas químicas e, conseqüentemente, com diferentes propriedades surfactantes como pôde ser observado na Tabela 3.1 (PARVEEN et al., 2014). Biotensoativos podem ser produzidos por vários organismos vivos que sintetizam compostos com propriedades surfactantes, como plantas, microrganismos e, menos citado, o organismo humano, com sais biliares (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

Para detectar a produção desses surfactantes por microrganismos há vários métodos rápidos. Entre eles, um que é bastante utilizado desde a década de 90, reportado por Carrillo et al. (1996) é o teste da atividade hemolítica, pois a hemólise das hemácias se relaciona com as propriedades anfipáticas dos biosurfactantes, caracterizando um fator preditivo para identificação primária da produção dessas biomoléculas, principalmente as que são produzidas por bactérias. Tensoativos de origem microbiana podem ser subprodutos obtidos por via metabólica secundária de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que atuam na melhora do metabolismo de substâncias imiscíveis em água (BANAT et al., 2010; CHANDRAN e DAS, 2011; SOBRINHO et al., 2013).

Estudos reportam diversos microrganismos que são grandes produtores de biosurfactantes, dentre eles os que ganham bastante destaque, são os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (SANTOS et al., 2016). As *Pseudomonas* são conhecidas por sua produção potencial glicolipídeos, que são classificados como rhamnolipídeos que possuem alta atividade surfactante, e na mesma proporção as bactérias do gênero *Bacillus* grandes produtoras de lipopetídeos também conhecidos por surfactantes de grande eficiência.

Contudo, não são apenas bactérias que produzem biomoléculas com alta atividade surfactante. Apesar dos estudos serem bastante voltados a elas, as leveduras, como por exemplo as do gênero *Candida*, *Starmerella* e *Pseudozyma* também são capazes de produzir biosurfactantes de alta eficiência que podem ser utilizados em todos os setores da indústria por serem considerados biologicamente seguros devido a sua não patogenicidade. Na

literatura ainda é possível encontrar estudos da produção pelos gêneros *Rhodotorula sp.*, *Pichia sp.*, *Debaromyces sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Yarrowia sp.* e *Cutaneotrichosporon sp.*. Leveduras descritas como lipases positivas e oleaginosas, acumuladoras de lipídeos intracelulares destacam-se como melhores produtoras de biossurfactantes (HOMMEL et al., 1994; DOUROU et al., 2017).

3.2.1 Gênero *Bacillus*

As espécies do gênero *Bacillus* são cosmopolitas e morfologicamente diversificadas, produtoras de lipopeptídeos cíclicos com atividade de superfície que podem ser conhecidos como iturinas, fengicinas, liquenisininas e surfactinas (LIU et al., 2010; SOUZA et al., 2014; AL-BAHRY et al., 2013). Os compostos de iturina são formados pela presença de sete aminoácidos cíclicos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -amino. Esse grupo apresenta oito isoformas (iturinas A, AL e C, micosubtilisina, bacilopeptina e bacilomicinas D, F e L) todas com grande potencial antifúngico, atuando também como biopesticida. As fengicinas, em contrapartida, possuem quatro isoformas, e são caracterizadas por um lipodecapeptídeo ligado a um ácido graxo β -hidróxi de cadeia variável entre 11 e 14 átomos de carbono que também apresenta ação antifúngica (SEN, 2010; NERURKAR, 2010; INÈS e DHOUHA, 2015).

Biossurfactantes lipopeptídicos apresentam propriedades antimicrobianas, pois interagem de forma ampla com as membranas celulares, e além dessa importante propriedade, também podem atuar na remoção de compostos hidrofóbicos do meio ambiente (MARCHANT et al., 2014). Pathak e Keharia (2014) em seus estudos isolaram a linhagem de *B. subtilis* K1 a partir de raízes aéreas de uma planta da espécie *Ficus benghalensis*. Esse microrganismo produziu uma mistura de surfactinas, iturinas e fengicinas com atividade emulsificante alta e estável e também apresentou bons resultados em teste com meio poroso, sugerindo possível aplicabilidade em MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery). É importante destacar que não são só as bactérias pertencentes a classe *subtilis* que possuem capacidade de sintetizar biomoléculas, há também os *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*. A produção da biomolécula, por esses microrganismos, ocorre durante a fase estacionária, quando os nutrientes no meio de cultura são limitados (DURVAL, 2017).

Dentre os compostos acima citados a surfactina recebe grande destaque nos estudos devido a sua indicação de maior eficiência em biorremediação e recuperação avançada do petróleo por microrganismos, apresentando resultados mais favoráveis quando comparada aos rhamnolipídeos e, dessa forma, pode ter potencial para o desenvolvimento bioindustrial em

grande escala (MARCHANT et al., 2014). Além de potencial utilização como MEOR também é amplamente utilizada na área de cosméticos, e são utilizadas para inibir a formação de biofilme e promover ação antimicrobiana, podendo ser empregada como demaquilantes na remoção de células mortas e branqueamento. Os produtos adicionados desse biotensioativo oferecem baixos efeitos colaterais como irritação a pele e promove ação antimicrobiana quando dermatologicamente testado (LOURITH, KANLAYAVATTANAKUL, 2009; RUFINO et al. 2011).

Em termos estruturais, a surfactina consiste em um heptapeptídeo ligado a um ácido graxo β -hidróxi, que contenha um número de 13 a 15 carbonos, características observadas por Faria et al. (2011) na biomolécula produzida por *B. subtilis* LSFM-05 e numa surfactina comercial. Sua estrutura já havia sido descrita por Arima et al. (1968) como um lipopeptídeo aniônico de massa molecular igual a 1050 ± 100 Da, formado por cristais em agulha de coloração branca, com ponto de fusão entre 137-140°C. Este composto também possui solubilidade em água alcalinizada, acetona, metanol, etanol, benzeno, clorofórmio e ácido acético glacial e é insolúvel em água e ácidos minerais, também apresenta fraca solubilidade em tetracloreto de carbono, éter de petróleo, hexano e ciclohexano. As moléculas de surfactina são estáveis em faixa de pH de 7-9 a 120 °C por 30 minutos, apresenta reação positiva para biureto e negativa para ninhidrina, sendo precipitada em soluções alcalinas com 50% de saturação com sulfato de amônio ou metais divalentes.

De modo geral, os fatores que influenciam na produção de biosurfactantessão concentração de fonte de carbono enitrogênio, pH, temperatura, aeração, agitação e formas de condução de processo. Assim, diversos estudos ao longo dos anos utilizando cepas de *Bacillus sp.* mostram uma gama de substratos utilizados como fonte de carbono, que podem ser constituídas de carboidratos simples até hidrocarbonetos, nitrogênio, variações de pH e temperatura.

Alguns exemplos são os estudos reportados por Sakthipriya et al. (2015), sobre a produção de biosurfactante por uma linhagem termofílica de *Bacillus subtilis* usando diferentes hidrocarbonetos como substratos. A produção máxima ocorreu em 50 °C utilizando n-hexadecano como fonte de carbono. Alvarez et al. (2015), observaram a produção de emulsificantes por *Bacillus amyloliquefaciens*. O agente emulsificante, identificado como surfactina, foi produzido em temperaturas de até 50 °C, em salinidades variadas (0,5 a 7%) e pH entre 6 a 9, com capacidade de reduzir a tensão superficial do meio decultivo para 28,5 mN/m e de produzir camadas de emulsificação de até 63%.

Existem alguns estudos sobre a otimização dos meios líquidos e condições de cultura para obtenção de biossurfactantes produzidos por cepas do gênero *Bacillus*. Al-Ajlani et al., (2007), otimizando a produção de surfactina, obtiveram um rendimento de $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ utilizando sacarose como fonte de carbono e adicionando ferro ao meio de cultivo. Já Abdel-Mawgoud et al., (2008) estudaram a produtividade de *B. subtilis* usando melaço como fonte de carbono e obtiveram um rendimento de $1,12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Foi estudado ainda o efeito de elementos traço para produção da surfactina por *B. subtilis*, obtendo-se um rendimento de $3,34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ com a adição de $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de Mg^{+2} e 10 mmol/L de K^{+} (WEI et al., 2007). A mais alta produção de surfactina relatada na literatura foi de $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, produzida por uma cepa mutante de *B. subtilis* que foi cultivada em extrato aquoso de farinha de soja (YONEDA et al., 2006). Das e Mukherjee (2007) compararam a produção de biossurfactante por duas cepas de *B. subtilis* por FS e FES, utilizando cascas de batata como substrato. A quantidade de biossurfactante produzido foi similar em ambos os sistemas, com produções de 102 e 92 $\text{g} \cdot \text{kgSS}^{-1}$ no cultivo submerso e em estado sólido, respectivamente.

3.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

As técnicas de *downstream* na produção de biossurfactantes, abrangem as etapas de recuperação, concentração e purificação, sendo que a escolha do método apropriado para o processamento depende do tipo e natureza dos substratos, da técnica de cultivo e das propriedades físico-químicas dos biossurfactantes excretados, que podem ser classificados como intracelulares ou extracelulares (SEN e SWAMINATHAN, 2005).

Os biossurfactantes extracelulares deverão ser extraídos do meio de cultivo após a separação das células, em contrapartida os intracelulares dependem do rompimento das células associada a processos posteriores de recuperação, que podem incluir precipitação com ácidos ou sais, extração com solvente, cristalização e centrifugação (DESAI e BANAT, 1997).

Na Tabela 3.4 estão alguns dos processos mais estudados atualmente e sua utilização para cada tipo de biossurfactante. No processo de extração por solventes são geralmente utilizados o acetato de etila, acetona, diclorometano, clorofórmio-etanol (2:1), clorofórmio-metanol (2:1). O solvente é removido por evaporação rotativa a 40°C , de onde se obtém o produto que pode ser purificado por cromatografia e cristalizado (DUBEY e JUWARKAR, 2001; JOSHI et al., 2008; ABOUSEOUD et al., 2008; YIN et al., 2009; LOTFABAD et al., 2009; PANSIRIPAT et al. 2010).

Tabela 3.4 - Tipos de processos utilizados para extração de biossurfactante

Tipos de processos	Tipos de biossurfactantes
Precipitação por sulfato de amônio	Emulsão, bioemulsificante
Precipitação por acetona	Bioemulsificante
Precipitação ácida	Surfactina e lichenysin
Extração por solvente orgânico	Trealolípídios, soforolípídios
Cristalização	Glicolípídios
Centrifugação	Glicolípídios
Adsorção	Ramnolípídios e glicolípídios
Fracionamento por espuma	Surfactina
Filtração por fluxo tangencial	Mistura de biossurfactante
Diafiltração e precipitação	Glicolípídios
Ultrafiltração por membrana	Glicolípídios e surfactina

Fonte: Coelho (2018)

Na recuperação por precipitação, os sais como o sulfato de alumínio e sulfato de amônio, além de ácidos como HCl e o H_2SO_4 podem ser utilizados. Na precipitação por ácidos o sobrenadante passa por um processo de acidificação até pH 2 ou 3 com o objetivo de reduzir a solubilidade do biossurfactante, seguido de resfriamento a 4 °C por períodos determinados e posterior centrifugação e recolhimento do precipitado (SCHENK, SCHUPHAN e SCHMIDT, 1995; MUKHERJEE, DAS e SEN, 2006; SARIN e SARIN, 2008; NITSCHKE, COSTA e CONTIERO, 2010).

Embora sejam métodos relativamente simples, são demorados, o que caracteriza um dos principais inconvenientes para a recuperação convencional. Além disso, os solventes orgânicos voláteis e as substâncias químicas utilizadas para a extração de solvente, também são dispendiosos, poluentes do ar e tóxicos para a saúde (SEN e SWAMINATHAN, 2005).

Métodos conhecidos como não convencionais de recuperação estão sendo estudados, e avaliam a atividade superficial e a capacidade de formar micelas dos biossurfactantes, sendo aplicáveis para a recuperação de biossurfactantes extracelulares em meios de cultivo. Exemplos dessas formas de recuperação de biotensoativos incluem o fracionamento de espuma, ultrafiltração, adsorção-dessorção com resinas de poliestireno, adsorção-dessorção com carvão ativado à base de madeira e cromatografia de troca iônica. A principal vantagem destes métodos é a habilidade para operar em modo contínuo e com elevado grau de pureza (MUKHERJEE, DAS e SEN, 2006).

Os biossurfactantes do tipo surfactina produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, respectivamente, são recuperados do meio de cultura principalmente pelo método de precipitação ácida. Contudo outros métodos são empregados em menor escala

como extração com solventes orgânicos e cristalização, para processos em batelada e centrifugação, adsorção separação de espuma e precipitação, filtração com escoamento tangencial, diafiltração e precipitação, e ultrafiltração, para processos contínuos. (MULLIGAN e GIBBS, 1990).

Dentre as vantagens da precipitação ácida estão o custo baixo e a eficiência na recuperação do surfactante bruto. O pH do meio é ajustado para o ponto isoelétrico do composto que se deseja recuperar e posteriormente faz-se uma extração líquido-líquido ou sólido líquido que são métodos mais simples para purificar e concentrar estes lipopetídeos (COELHO, 2018).

A técnica de fracionamento de espuma consiste no fenômeno de adsorção das moléculas tensoativas na interface gás-líquido. Utiliza-se uma injeção de gás pela base de uma coluna através de placas de vidro e à medida que as bolhas de gás ascendem através da solução, as moléculas se concentram na interface gás-líquido e são transportadas para a fase espuma, que se formará quando as bolhas possibilitarem o surgimento de uma grande área superficial favorecendo a adsorção das substâncias tensoativas na interface gás-líquido. Nessa solução encontra-se o biossurfactante a ser separado ou concentrado.

O uso de colunas para a fase espuma possibilita a elevação axial da espuma, realizando uma drenagem da porção da fase líquida, isso proporciona a concentração do soluto com atividade de superfície ao longo da coluna e a solução concentrada, obtida pela remoção e colapso da espuma no topo da coluna, sendo coletada como produto (COELHO, 2018). Deste modo a espuma gerada pode ser removida obtendo-se uma solução enriquecida no soluto tensoativo. A vantagem desse sistema está na recuperação primária em processos contínuos e de batelada e a não utilização de solventes ou equipamentos de grande porte e obtenção de um grau de pureza considerável do biotensoativo (LUCENA, SANTANA, 2000).

Vários estudos, além de comprovarem a produção de biossurfactante pelos métodos do índice de emulsificação e medida da tensão superficial, avaliaram a estabilidade dos biossurfactantes em condições diversas de temperatura, pressão, força iônica, pH e presença de solventes orgânicos e mostraram haver significativa estabilidade dos biossurfactantes mesmo quando comparados a compostos sintéticos utilizados industrialmente (BARROS et al., 2007; KHOPADE et al., 2012, NITSCHKE e PASTORE, 2006; SOARES, 2014). Alguns desses estudos reportaram que as propriedades físico-químicas de alguns biossurfactantes se mantêm constantes mesmo com mudanças extremas de temperatura (BOGNOLO, 1999).

Horowitz et al. (1990) verificaram que as propriedades físico-químicas do lipopeptídeo produzido por *Bacillus licheniformis* 86 permaneceram estáveis após exposição a 75°C por até 140 horas. Nitschke e Pastore (2005) também obtiveram em seus estudos que o lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* LB5a permaneceu estável após exposição a 121°C por 20 min e também após 6 meses congelados a -18°C. As microemulsões de biossurfactantes que demonstrem estabilidade em temperaturas acima de 40°C, os torna adequados para aplicações cosméticas e farmacêuticas (GUDIÑA et al., 2013).

No que diz respeito as propriedades de superfície dos surfactantes também podem-se afirmar que são mantidas após exposição as condições extremas de pH e salinidade. O microrganismo *Bacillus licheniformis* JF-2 isolado de água de injeção de poços de petróleo produziu lichenisina em meio de cultura contendo até 10% de NaCl em temperaturas de até 50° C e pH na faixa de 4,6 a 9,0 (JAVAHERI et al., 1985). A tensão superficial também não sofreu mudanças após exposição do biossurfactante à diferentes faixas de pH 5 a 11 e concentrações de NaCl de até 20% (NITSCHKE e PASTORE, 2005).

3.4. UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS INDUTORES

A quantidade e o tipo de matéria-prima utilizada como substrato para o desenvolvimento do microrganismo é o fator mais preocupante no processo do ponto de vista econômico, devido a estimativas que supõe cerca de 30% do custo total de produção dos biotensoativos está vinculado à obtenção de substratos (CAMEOTRA, MAKKAR, 1998). Diante disso, o uso de substratos renováveis e/ou com baixo custo provenientes da agroindústria, torna-se imprescindível para viabilizar essa produção (FARIA, 2010).

Dentre as matérias-primas renováveis utilizadas para a produção de biossurfactantes, podemos citar o uso de óleos vegetais, como descrito por Rahman et al. (2002) em seus estudos de produção de ramnolipídios através da utilização de óleo de soja e de girassol. O aproveitamento de resíduos provenientes de refinarias de extração de óleos vegetais também são bons substratos para produção de glicolipídios (BENINCASA et al., 2004). Os resíduos oleosos são degradados pelos microrganismos que são capazes de utilizar hidrocarbonetos como fontes de carbono para obtenção de energia. Estudos apontam que microrganismos ambientados a crescer em óleo são bons produtores de biossurfactantes (DECESARO et al., 2013).

3.4.1 Caldo de cana de açúcar

O caldo de cana, é constituído quantitativamente por água (80%) e sólidos totais dissolvidos (20%). Dos sólidos totais destacam-se principalmente os açúcares em maior quantidade a sacarose (17%), seguido de glicose (0,4%) e frutose (0,2%). Também compõe os sólidos totais as substâncias nitrogenadas, gorduras, ceras, pectinas, ácidos orgânicos e matérias corantes e os minerais (FILHO et al., 2015).

O caldo da cana-de-açúcar contém, em média 200-600 ppm de nitrogênio, do qual cerca de 60% está presente como amônia e amino-compostos. Os compostos nitrogenados compreendem amidas de aminoácidos (asparagina e glutamina), compostos de alta massa molecular (proteínas) e aminoácidos (ácido aspártico e glutâmico) (SHARMA, JOHARY, 1984). Os constituintes inorgânicos da cana-de-açúcar ocorrem na forma de íons, sais, integrantes de complexos moleculares orgânicos ou como compostos insolúveis. Os principais cátions são o potássio, elemento que aparece em maior quantidade (60% das cinzas presentes no caldo), cálcio, ferro, alumínio, sódio, magnésio, manganês, cobre, zinco e boro. Entre os ânions destacam-se os fosfatos, cloretos, sulfatos, nitratos, silicatos e oxalatos (CHEN, CHOU, 1993). Por conter nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH entre 5,0 e 5,5 o caldo de cana constitui-se em ótimo substrato para o crescimento de grande e diversificada microbiota. Os microrganismos mais importantes em associação com o caldo são essencialmente aqueles oriundos do solo e dos vegetais, dentre os quais se destacam os fungos filamentosos e leveduriformes, e as bactérias lácticas e esporuladas.

3.4.2 Óleo de abacate

Os frutos do abacateiro possuem elevados teores de matéria graxa na polpa, constituindo-se em uma matéria prima de interesse para a extração de óleo, sendo uma das possibilidades de expansão do seu consumo diante de seu alto valor nutricional. Entretanto o principal obstáculo para obtenção do óleo é o teor de umidade, que na polpa fresca varia de 64 a 85%, afetando o rendimento de extração, a qualidade do óleo e o seu custo de produção. A elevada proporção de casca e caroço também encarecem o custo de transporte (TANGO; TURATTI, 1992).

O óleo de abacate caracteriza-se por apresentar teores elevados dos ácidos graxos monoinsaturados: oleico e palmitoléico, sendo o último encontrado em pequenas quantidades em outros óleos. Entre os principais componentes dos triacilgliceróis deste óleo também estão

o linoléico e o linolênico, além de teor relativamente elevado do ácido graxo saturado palmítico e menor conteúdo do ácido esteárico (saturado). A proporção dos diferentes ácidos graxos no óleo de abacate de uma mesma variedade é influenciada pelo grau de maturação do fruto, pela localização da cultura e pelo clima (TANGO; TURATTI, 1992).

Como mostra a pesquisa realizada por Berasategi et al. (2012) o óleo de abacate apresenta características semelhantes ao óleo de oliva, ambos possuem fitoesteróis, que possuem ação antioxidante, e uma grande fração do ácido graxo monoinsaturado oleico. Estes fatores fazem com estes óleos possuam maior estabilidade térmica comparado a outros óleos vegetais. Outra vantagem apresentada pelo óleo de abacate é que sua menor fração monoinsaturada é compensada pelo maior conteúdo de poli-insaturados, sendo possível destacar a presença de grande quantidade do ácido linoléico (ômega 6), considerado um ácido graxo essencial. O óleo de abacate possui alto valor comercial, e é utilizado principalmente pela indústria farmacêutica e de cosméticos, diante disso e de seu valor nutricional e a características de seus compostos, possui grande potencial na produção de biomoléculas tensoativas.

3.4.3 Óleo residual de soja

Os óleos vegetais são uma fonte de carbono e constituído por ácidos graxos saturados ou insaturados (MAROTTI, 2017). Os enormes custos associados ao tratamento destes resíduos e os nutrientes presentes nos mesmos os tornam matérias-primas de baixo custo para a produção de metabólitos secundários. A utilização de substratos renováveis na produção de biossurfactantes com alto rendimento trazem o avanço necessário para redução de custos no processo de produção (BANAT et al., 2010; MAKKAR et al., 2011).

A maioria das indústrias de alimentos utilizam gorduras e óleos o que gera grandes quantidades de resíduos hidrofóbicos. Diante das alterações físico-químicas, é importante que o óleo de soja residual de fritura seja imediatamente descartado após o processo de fritura, pois entre os principais riscos à saúde envolvidos no consumo dessas substâncias pode-se citar a pré-disposição à arteriosclerose e a ação mutagênica ou carcinogênica. Devido a isso, é interessante direcionar o descarte correto desse óleo. Com o acúmulo desses resíduos, tem aumentado o interesse da utilização desses materiais como fonte de nutrientes para transformação microbiana (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; PAPANIKOLAOU 2002; JORGE, et al., 2005). Vários estudos vêm utilizados substratos hidrofóbicos, como óleo de

soja pós-fritura, para a produção de biossurfactantes (PELIZER et al., 2007; SARUBBO et al., 2007, RUFINO et al., 2008, SOUZA et al., 2012, SANTOS et al., 2013)

4 METODOLOGIA

4.1. OBTENÇÃO DOS SUBSTRATOS

Para composição dos meios de cultivo foram escolhidos caldo de cana, óleo de abacate e óleo residual de soja, a fim de testá-los quanto a eficiência na produção de biossurfactante.

Para obtenção do óleo de abacate foi escolhida a variedade Margarida devido a sua sazonalidade. Os abacates foram obtidos no comércio local da cidade de João Pessoa- PB e cuidadosamente higienizados, para posterior processamento. Os frutos foram pesados inteiros e após o descasque para realizar o cálculo do rendimento. Para obtenção do óleo foi utilizado somente a polpa, que foi distribuída em bandejas de alumínio para secar em estufa de circulação de ar a 60° C por 48 h. Após a secagem a polpa foi prensada a frio utilizando para tanto uma prensa hidráulica do Laboratório de Análises e Pesquisa de Bebidas Alcoólicas da Universidade Federal da Paraíba, para extração do óleo.

O caldo de cana foi obtido de vendedores locais na cidade de Cabedelo e acondicionado em garrafas plásticas sob refrigeração até sua utilização. O óleo de soja residual foi cedido de um restaurante da Universidade Federal da Paraíba.

Figura 4.1- Caldo de cana e óleo de abacate utilizado na composição dos meios.



4.2 CARACTERIZAÇÃO DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O caldo de cana foi caracterizado quanto ao pH, sólidos solúveis totais (°Brix), açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART).

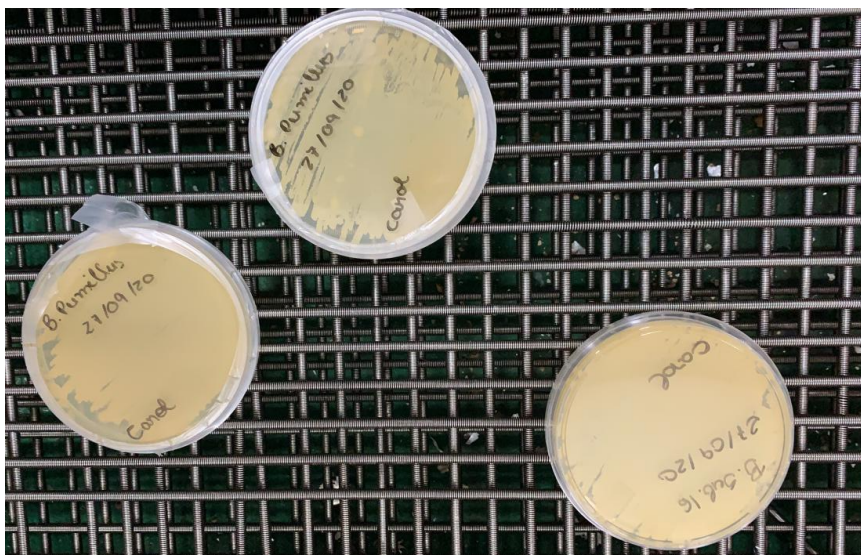
A medida do potencial hidrogeniônico das amostras foi determinada através de medidas diretas em um pHmetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. O teor de sólidos solúveis totais (°Brix) foi determinado em um refratômetro digital de bancada (IAL,2008). Para determinar a quantidade de açúcares redutores e açúcares redutores totais utilizou-se o método de DNS, proposto inicialmente por Miller (1959), adaptado por Vasconcelos (2013).

4.3 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram pré-selecionados com relação a boa produção de biossurfactantes para serem testados em cultivos utilizando diferentes substratos.

Foram realizados testes com os microrganismos: *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e UFPEDA 86 cedidos pelo departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e *Bacillus pumilus* isolado do solo cultivado de cana de açúcar de uma usinada região e cedido pelo centro de Biotecnologia da UFPB. As culturas foram mantidas em Meio Lúria-Bertani composto por Ágar (20 g/L), Peptona (10 g/L), Extrato de levedura (5 g/L), Cloreto de sódio (10 g/L). Os microrganismos foram repicados periodicamente para manter a viabilidade celular, incubados a 37°C por 24h (Figura 4.2) e posteriormente mantidos sob refrigeração a 4°C.

Figura 4.2 - Microrganismos utilizados na produção do biossurfactante.



4.4 SELEÇÃO DOS SUBSTRATOS INDUTORES

Inicialmente, foram realizados cultivos utilizando um meio base com duas fontes indutoras, óleo de abacate e óleo residual, a fim de avaliar a melhor produção de biossurfactante. Assim, a composição dos meios utilizados foram: caldo de cana (com 20 g.L⁻¹ de ART), (NH₄)₂SO₄ (1 g.L⁻¹) e óleo de abacate (2 g.L⁻¹); e caldo de cana (com 20 g.L⁻¹ de ART), (NH₄)₂SO₄ (1 g.L⁻¹) e óleo de residual (2 g.L⁻¹), respectivamente. O caldo de cana foi diluído para a concentração de açúcares redutores totais de 20 g.L⁻¹ a partir dos valores da concentração de açúcares redutores totais presentes do meio puro obtidas da caracterização. O óleo de abacate e residual foram adicionados diretamente ao meio na respectiva proporção.

Os frascos foram inoculados com 1% (v/v) de células obtidas através do preparo de um pré-inóculo utilizando o meio de manutenção Lúria-Bertanie incubados em mesa agitadora *shaker* a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. O processo fermentativo foi conduzido por 96 h e foram avaliados os parâmetros de índice de emulsificação em amostras retiradas a cada 24h para quantificar a produção de biossurfactante.

4.5 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

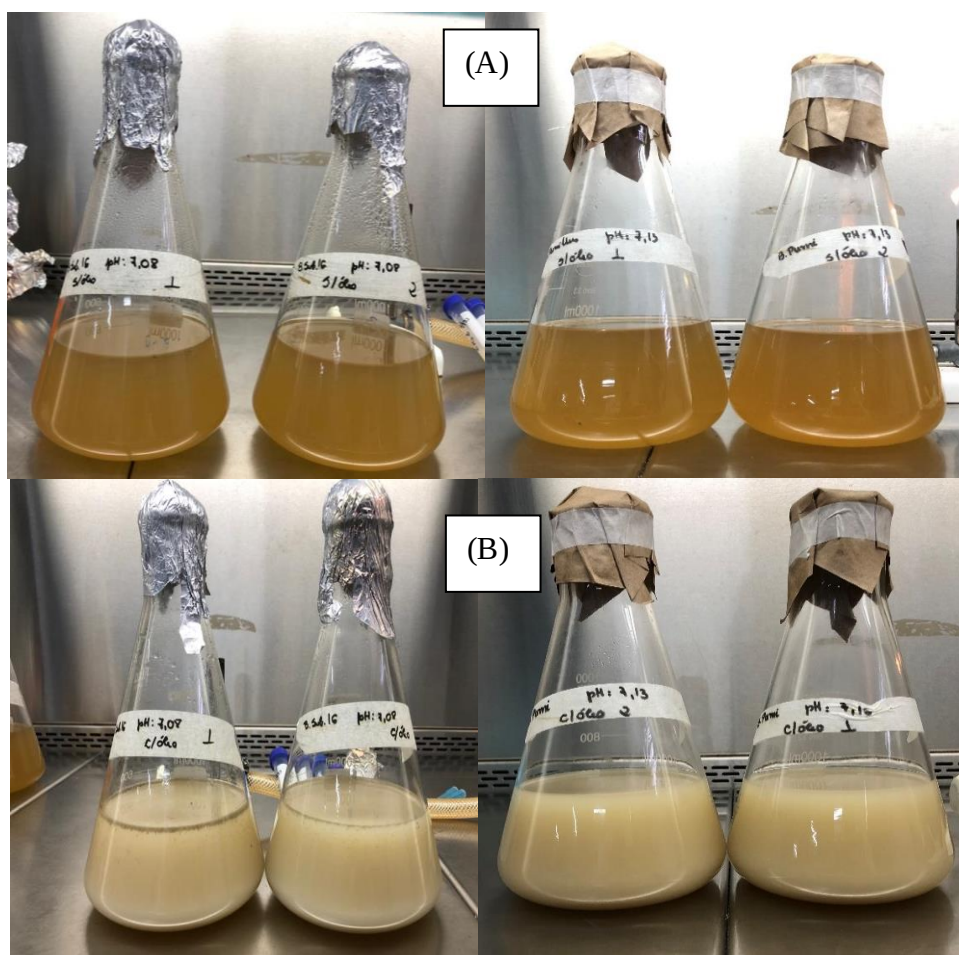
O inóculo foi preparado transferindo-se três alçadas da cepa do microrganismo em duplicata para erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL do meio de cultivo caldo de cana (20 g.L⁻¹), extrato de levedura (1 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹) e K₂HPO₄ (7 g.L⁻¹), previamente esterilizado em autoclave a 105°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. Foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm em intervalos de tempo durante 12 horas, a fim de acompanhar o crescimento microbiano e determinar o tempo ótimo de inóculo que se dá em leituras de absorbância entre 0,6 e 0,8.

4.6 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Experimentos foram realizados para estudo do comportamento das linhagens em meio de cultivo com e sem adição de óleo de abacate. A composição do meio utilizado foi: caldo de cana (20 g.L⁻¹), extrato de levedura (1,0 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (7 g.L⁻¹) com ou sem adição de óleo de abacate (2,0 g.L⁻¹). A produção de biossurfactantes ocorreu por

meio de um processo de fermentação submersa, em que foram utilizados frascos erlenmeyers de 1000 mL, contendo 610 mL de meio. O meio foi previamente esterilizado a 105°C por 15 minutos e inoculado com uma concentração de células de 10 % (v/v). Após isso, os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora *shaker* a 34°C e agitação orbital de 200 rpm por 48h. Amostras foram retiradas a cada 2 h até 12 h para o acompanhamento cinético e após isso a cada 24 h até o fim do cultivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e sob as mesmas condições de temperatura, agitação, pH e concentração de inóculo. Nestes experimentos foram analisados o crescimento microbiano, o consumo de substrato, pH inicial e final, a porcentagem do índice de emulsificação e a tensão superficial.

Figura 4.3 -Produção de biossurfactante utilizando sem adição de óleo de abacate (A) e com adição de óleo de abacate.



4.7 ANÁLISES

4.7.1 Determinação do crescimento celular

Foram utilizados dois métodos para quantificação do crescimento celular, turbidimetria e peso seco. Para a determinação do crescimento celular utilizado o método da turbidimetria foram realizadas medidas da densidade óptica das amostras por meio de um espectrofotômetro na faixa do visível a um comprimento de onda de 600 nm. Para a determinação da concentração celular em g.L⁻¹ foi construída uma curva de calibração que correlacionava a absorbância do meio ao peso seco da amostra (VELOSO, 2007).

Para a obtenção do peso seco da amostra foi retirada uma alíquota de 2 mL da suspensão de células obtida a cada 24 h de cultivo, colocada em tubo previamente seco e pesado, e centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Passado esse tempo, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado foi seco em estufa a 80°C por 24h. Após isso, o tubo foi resfriado em dessecador por 15 min e pesado. Esse procedimento foi realizado em duplicata. A concentração em g.L⁻¹ da amostra foi obtida usando a Equação 1.

$$\text{Peso seco (g/L)} = \frac{(\text{mm} + \text{ps}) - \text{mm}}{v} \quad (1)$$

Onde:

mm = massa do microtubo (g)

ps = pellet de células secas (g)

v = volume da amostra (L)

4.7.2 Determinação do pH e açúcares redutores totais

A medida do potencial hidrogeniônico das amostras foi determinada através de medidas diretas em um pHmetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Para determinar a quantidade de açúcares redutores utilizou-se o método de DNS, proposto inicialmente por Miller (1959), adaptado por Vasconcelos (2013).

4.7.3 Índice de emulsificação e atividade emulsificante

Para o índice de emulsificação foi utilizado o método descrito por Cooper e Goldberg (1987), onde a razão de amostra:óleo foi reduzida de 4:6 para 2:3. A análise consistiu em misturar 2 mL do sobrenadante do meio livre de células a 3 mL de óleo vegetal, em tubos de ensaio de 10 mL, que posteriormente foram agitados vigorosamente em agitador do tipo vórtex por 1 min e deixados em temperatura ambiente por 24 h. A análise foi realizada em triplicata.

O índice de emulsificação foi então determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100 de acordo com a Equação 2 proposta por Wei et al., (2005).

$$IE_{24} = \frac{H_E}{H_T} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

IE_{24} = Índice de emulsificação após 24 h

H_E = Altura emulsificada

H_T = Altura total

A atividade emulsificante óleo em água foi determinada a partir de uma mistura de 2 mL da amostra e 2 mL de óleo de soja. A mistura foi agitada em agitador tipo vórtex na velocidade máxima por 2 min. Após 60 min de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado óleo/água em espectrofotômetro a 610 nm, calculando-se a atividade emulsificante óleo em água através da Equação 3.

$$AE_{o/a} = (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times D \quad (3)$$

Onde:

$AE_{o/a}$ = atividade emulsificante óleo em água (UE);

$AE_{a/o}$ = atividade emulsificante água em óleo (UE);

$Abs_{amostra}$ = absorbância da emulsão óleo/água;

Abs_{branco} = absorbância da amostra diluída;

D = diluição da amostra em água.

A atividade emulsificante óleo em água foi definida como a quantidade de biossurfactante necessária para aumentar a absorbância em 1,0 a 610 nm, e a atividade emulsificante água em óleo como a quantidade de biossurfactante necessária para manter a emulsão estável por 24 h.

4.7.4 Tensão superficial

A tensão superficial do caldo livre de células foi determinada pelo método do anel, usando um Tensiômetro sigma 700 (Figura 4.4) (KSV Instruments LTD - Finland) (SILVA et al., 2014). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em triplicata, e o equipamento foi calibrado com água destilada. As análises foram feitas com o sobrenadante obtido após a centrifugação do caldo fermentado das amostras, a uma temperatura de 25°C. A cada início de análise a tensão superficial da água destilada, cujo valor é de aproximadamente 72 mN/m, foi verificada, garantindo a calibração do tensiômetro.

Figura 4 - Tensiômetro sigma 700 realizando leitura de tensão superficial.



4.8 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

A obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento foi realizada segundo o proposto por Schmidell et al., (2001).

4.8.1 Produtividade em biomassa

Expressa a velocidade média do crescimento microbiano, onde se verifica a quantidade de biomassa produzida ao longo do tempo de cultivo. Onde, X é a concentração

final de células e X_0 é a concentração inicial e t é o tempo de cultivo em h. O cálculo é realizado conforme a Equação 4.

$$P_x = \frac{X - X_0}{t} \quad (4)$$

4.8.2 Velocidade específica de crescimento máxima

A velocidade específica de crescimento tem seu valor máximo na fase exponencial da curva de crescimento, onde a ação do metabolismo do microrganismo se dá de forma mais acentuada e efetiva. A velocidade corresponde à inclinação da reta obtida pelo gráfico do $\ln(X)$ versus t (tempo de cultivo), na fase mencionada, conforme a Equação 5.

$$\ln X = \mu_{\text{máx}} (T - T_i) + \ln X_i \quad (5)$$

Onde:

X = Quantidade de biomassa produzida

$\mu_{\text{máx}}$ = Velocidade específica máxima

T = Tempo de cultivo

4.8.3 Tempo de Geração

O tempo de geração é constante na fase exponencial de crescimento do microrganismo e permite mensurar a que tempo a concentração irá dobrar do seu valor inicial. O mesmo é calculado pela Equação 6.

$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (6)$$

Onde:

Tg = Tempo de geração

$\mu_{\text{máx}}$ = Velocidade específica máxima

4.8.4 Fator de conversão de substrato em biomassa

É a relação estabelecida entre a quantidade de biomassa produzida e o teor de substrato consumido. De modo que se verifica a influência de um sob o outro. Dado pela Equação 7, onde S_0 é a concentração inicial de substrato e S a final.

4.9 SEPARAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

O sobrenadante livre de células foi colocado em frascos previamente pesados, o biossurfactante foi separado por precipitação com etanol absoluto (1:3 v/v) e em seguida mantido em repouso por 24 h em uma temperatura de 4 °C. Após esse procedimento foi seco

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (7)$$

em estufa a 45 °C até peso constante. O pellet livre de umidade foi pesado e seu peso seco foi expresso em g/L.

4.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada usando o método de disco difusão de acordo com o manual do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). As cepas de patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442 foram crescidas por 24 h a 35 °C, temperatura ótima de crescimento para as cepas utilizadas, em caldo nutriente. Após esse período os microrganismos foram plaqueados em ágar nutriente a fim de se obter colônias isoladas. Três colônias isoladas foram transferidas para um tubo contendo 4 mL de água peptonada 0,1%. Foi preparado um tubo para cada microrganismo estudado em duplicata. Os tubos foram pré-incubados a 35 °C, até o tempo necessário para alcançar a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (resultando numa suspensão de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para bactérias). Em seguida com um swab de algodão estéril a suspensão foi plaqueada em placas de Petri de ágar nutriente. Discos estéreis contendo o caldo bruto e o semi purificado do biossurfactante foram colocados em cada placa e após 24 h foi mensurado o halo de inibição. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para o controle positivo foram utilizados os antibióticos Ampicilina e Levofloxacina e para controle negativo água destilada.

4.11 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE

Foram realizados estudos do efeito de diferentes níveis de salinidade, pH e temperatura no caldo bruto livre de células contendo biossurfactante segundo metodologia adaptada de Barros et al., (2008) e Nitschke e Pastore (2005) para tanto foram realizadas análises do índice de emulsificação. A emulsificação do biossurfactante foi avaliada medindo

a altura de emulsão seguindo metodologia descrita no item 4.7.3 nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h para todos os experimentos realizados utilizando óleo de soja, coco e algodão. Para a análise da estabilidade térmica, o meio de cultivo livre de células foi colocado em uma série de tubos de ensaio e submetidos a temperaturas de 40°C, 80°C e 100 °C por 30 minutos em banho maria. Após tratamento térmico, as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente para análise de índice de emulsificação. Para a análise da estabilidade frente ao pH, amostras do meio de cultivo livre de células foram colocadas em uma série de tubos e tiveram seus pHs ajustados para 2, 4, 6, 8 e 10 com um tempo de exposição de 30 minutos. Para a análise da estabilidade frente a força iônica, foram adicionadas diretamente as amostras quantidades de NaCl (p/v) nas concentrações 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5% e 10% por um tempo de exposição de 30 minutos. Amostras controles foram preparadas utilizando os óleos testados contendo o caldo bruto livre de células. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%, através do teste de comparação de médias de Tukey, com o auxílio do software Statistica 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e as discussões produzidos durante o desenvolvimento da dissertação estão apresentados em forma de artigos científicos a serem submetidos nos periódicos de impacto na área Engenharias II.

Artigo 1: SELEÇÃO DE INDUTORES E CEPAS DE *BACILLUS* PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES. (A ser submetido. Periódico: Reserch, Society and development. Qualis: A3 em Engenharias II).

Artigo 2: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR DUAS CEPAS DE *BACILLUS* EM MEIO COM E SEM ADIÇÃO DE ÓLEO DE ABACATE. (A ser submetido. Periódico: Reserch, Society and development. Qualis: A3 em Engenharias II).

Artigo 3: PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR PROCESSO SEMICONTÍNUO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS BIOMOLÉCULAS. (A ser submetido. Periódico: Reserch, Society and development. Qualis: A3 em Engenharias II).

5.1 ARTIGO 1

SELEÇÃO DE INDUTORES E CEPAS DE *Bacillus* PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

RESUMO: Neste estudo foram utilizadas três cepas de *Bacillus* a fim de avaliar a produção de biossurfactantes em meios contendo caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono e óleo de abacate ou óleo de soja residual como indutores. Os experimentos foram conduzidos sob mesmas condições em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo previamente esterilizados. Os frascos foram inoculados com 1% (v/v) de células e incubados em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. O processo fermentativo foi conduzido por 96 h e foram avaliados os parâmetros de índice de emulsificação a fim de mensurar a capacidade de produção de biossurfactante. Os indutores propostos apresentaram resultados satisfatórios na produção de bioemulsificantes com valores de percentual de emulsão de 57,14% e 59,41% para *B. subtilis* UFPEDA16, nos meios com óleo de abacate e óleo de soja residual, respectivamente. A cepa *B. subtilis* UFPEDA86 mostraram percentuais semelhantes com 58,82% e 58,20% na capacidade de emulsificação dos referidos indutores. Já a cepa *B. pumilus*, os percentuais de emulsificação foram mais expressivos atingindo valores de 65,21% e 66,19%. Os resultados demonstraram que a produção de bioemulsificantes utilizando caldo de cana com óleo de abacate ou óleo residual de soja é promissora.

Palavras-chave: Bioemulsificantes; óleo de abacate; óleo residual

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas produzidos por um amplo espectro de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Essas moléculas são liberadas extracelularmente ou como componentes da membrana celular. Podem ser utilizados na bioremediação, agricultura, cosméticos, processamento de alimentos, além das indústrias farmacêutica e de petróleo. Possuem características únicas como emulsificação, detergência, agentes espumantes, inibição de corrosão, bem como lubrificação. Além disso, a biodegradabilidade, não toxicidade e eficácia em condições ambientais severas são algumas das vantagens em relação aos surfactantes de origem química (Roy, 2018; Sharma et al., 2020).

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos são classificados quanto a sua composição química são eles: glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídeos, poliméricos e particulados (Varjani & Upasani, 2017). Bactérias do gênero *Bacillus* sp. são amplamente estudadas devido a produção de lipopeptídeos que são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 (mN/m⁻¹) para 27 (mN/m⁻¹), como a surfactina. Os lipopeptídeos mais comumente produzidos por *Bacillus* sp. são a surfactina, iturina e fengicina (Mouafi et al., 2016; Heryani & Putra, 2017). Os biossurfactantes produzidos por diferentes cepas possuem características particulares como redução de tensão, capacidade emulsificante, rendimento e estabilidade (Sharma et al., 2020). No que diz respeito a produção os biossurfactantes ainda não são empregados em larga escala, principalmente devido ao baixo rendimento da produção e produtividade, altos custos de matéria-prima e purificação. Dessa forma uma estratégia para redução de custos é o uso de substratos alternativos, contendo carboidratos e/ou lipídios, a fim de aumentar a biossíntese do biossurfactante (Al-Bahry et al., 2013; Anjum et al., 2016; Nogueira Felix et al., 2019).

A produção de biossurfactante depende do tipo de microrganismo utilizado e também de fatores como a natureza da fonte de carbono, a fonte de nitrogênio, proporção de nitrogênio, restrições nutritivas e parâmetros como temperatura, pH, circulação de ar, e salinidade. Diferentes fontes de carbono têm sido utilizadas para produção de biossurfactante. Diesel, petróleo bruto, glicose, sacarose, glicerol foram indicados como um fonte de substrato de carbono para produção de biossurfactante (Roy, 2018).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo a região Nordeste como a terceira maior produtora entre as cinco regiões do país, segundo dados publicados pelo Diário Econômico do Banco do Nordeste (2018), o que justifica um estudo detalhado sobre as formas de explorar essa matéria prima agroindustrial. O caldo da cana-de-açúcar é rico em carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais e, portanto, pode ser potencialmente adequado para cultivo microbiano, mostrando resultados promissores para a produção de biossurfactantes. Neste estudo foram utilizadas três cepas de *Bacillus* a fim de testá-las em meios contendo caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono e óleo de abacate ou óleo de soja residual como indutores.

2. METODOLOGIA

2.1 Substratos indutores

Os abacates da variedade margarida foram obtidos no comércio local da cidade de João Pessoa-PB e cuidadosamente higienizados, para posterior processamento. Para obtenção do óleo foi utilizado somente a polpa, que foi distribuída em bandejas de alumínio e levadas para secar em estufa de circulação de ar a 60° C por 48 h. Após a secagem a polpa foi prensada a frio utilizando para tanto uma prensa hidráulica do Laboratório de Análises e Pesquisa de Bebidas Alcoólicas da Universidade Federal da Paraíba, para extração do óleo. O caldo de cana foi obtido de vendedores locais na cidade de Cabedelo e acondicionado em garrafas plásticas sob refrigeração até sua utilização. O óleo de soja residual foi cedido de um restaurante da Universidade Federal da Paraíba.

O caldo de cana de açúcar foi caracterizado quanto ao pH, sólidos solúveis (°Brix), açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART). A medida do potencial hidrogeniônico das amostras foi determinada através de medidas diretas em um pHmetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. O teor de sólidos solúveis foi determinado em um refratômetro digital de bancada (IAL,2008). Para determinar a quantidade de açúcares redutores utilizou-se o método de DNS, proposto inicialmente por Miller (1959), adaptado por Vasconcelos et al. (2013).

2.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram pré-selecionados com relação a boa produção de biossurfactantes para serem testados em cultivos utilizando meios alternativos. Foram realizados testes com os microrganismos: *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e UFPEDA 86 cedidos pelo departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e *Bacillus pumilus* isolado do solo cultivado de cana de açúcar de uma usina da região e cedido pelo centro de Biotecnologia da UFPB. As culturas foram mantidas em meio Lúria-Bertani composto por ágar (20 g/L), peptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (10 g/L). Os microrganismos foram repicados periodicamente para manter a viabilidade celular, incubados a 37°C por 24h e posteriormente mantidos sob refrigeração a 4°C.

2.3 Padronização do inóculo

O inóculo foi preparado transferindo-se três alçadas da cepa do microrganismo em duplicata para erlenmeyers de 300 mL contendo 100 mL do meio de manutenção Lúria-Bertani sem ágar, previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. Foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm em intervalos de tempo durante 12 h, a fim de acompanhar o crescimento microbiano e determinar o tempo ótimo de inóculo que se dá em leituras de absorbância entre 0,6 e 0,8. Passado esse tempo, o meio foi centrifugado em tubo de 50 mL, a 4500 rpm por 10 min., o sobrenadante foi descartado e apenas as células foram ressuspensas em 25 mL de água destilada estéril e adicionadas em concentração de 1% (v/v) aos meios de cultivo.

2.4 Seleção das fontes indutoras e cepa de *Bacillus*

Foram realizados cultivos utilizando dois indutores para avaliar o melhor para produção do biossurfactante. A composição do meio foi: caldo de cana (diluído para obter 20,0 g.L⁻¹ de ART), (NH₄)₂SO₄ (1,0 g.L⁻¹) e óleo de abacate (2,0 g.L⁻¹) ou óleo de soja residual (2,0 g.L⁻¹). Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Os frascos foram inoculados com 1% (v/v) de

células de cada uma das cepas de *Bacillus* avaliadas e incubados em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm, todos os cultivos foram realizados em triplicata. O processo fermentativo foi conduzido por 96 h e foram avaliados os parâmetros de índice de emulsificação em amostras retiradas a cada 24h.

2.5 Análises do índice de emulsificação IE

Para o índice de emulsificação foi utilizado o método descrito por Cooper e Goldberg (1987), onde a razão de amostra:óleo foi reduzida de 4:6 para 2:3. A análise consistiu em misturar 2 mL do sobrenadante do meio livre de células a 3 mL de óleo vegetal, em tubos de ensaio de 10 mL, que posteriormente foram agitados vigorosamente em agitador do tipo vórtex por 1 min e deixados em temperatura ambiente por 24h. A análise foi realizada em triplicata.

O índice de emulsificação foi então determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100 de acordo com a Equação 1 proposta por Wei et al., (2005).

$$IE_{24} = \frac{H_E}{H_T} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

IE_{24} = Índice de emulsificação após 24 h

H_E = Altura emulsificada

H_T = Altura total

2.6 Análise estatística

Os resultados das análises de índice de emulsificação obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%, através do teste de comparação de médias de Tukey, com o auxílio do software Statistica 7.0. Foram analisadas as comparações de médias nos tempos de cultivo de 24 até 96 h a fim de avaliar se haviam diferenças significativas entre as amostras.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do substrato

A caracterização foi realizada com o objetivo de adequar o caldo de cana para o processo fermentativo. A Tabela 1 apresenta os resultados da caracterização do caldo de cana-de-açúcar.

Tabela 1 - Características físico-químicas do caldo de cana-de-açúcar

Parâmetro	Valor
pH	5,3
°Brix	24,2
AR (g.L ⁻¹)	21,24
ART (g.L ⁻¹)	201,43

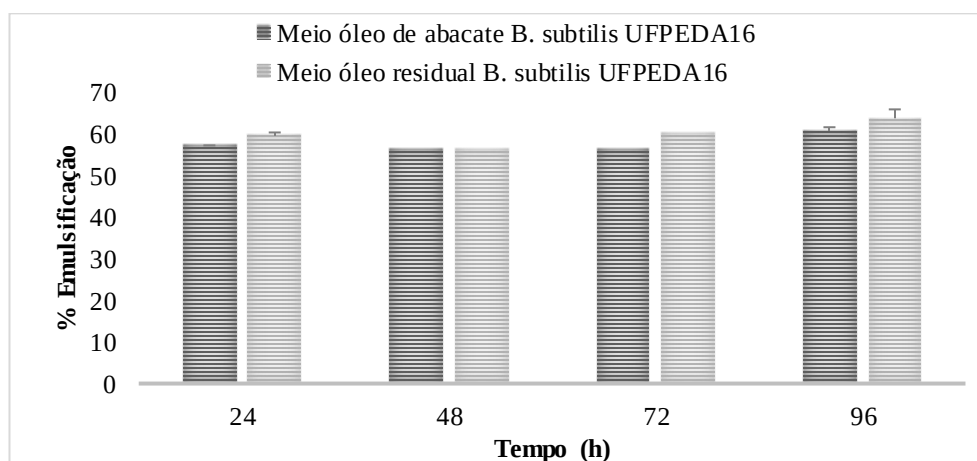
Fonte: Autora

O pH obtido para o caldo foi de 5,3 valor considerado ácido e não ideal para o cultivo de bactérias, pois no geral às bactérias se desenvolvem melhor em pH próximo a neutralidade. Quanto a concentração de ART é bastante elevada, sendo necessário fazer diluição para que a concentração ficasse em torno de 20 g/L de ART. A diluição contribui para reduzir a concentração de ART e também para aumentar o pH do meio, já que o pH da água destilada, usada na diluição é próxima a neutralidade em torno de 6,0.

3.2 Seleção do indutor e cepa de *Bacillus*

O óleo de abacate e o óleo residual de soja foram avaliados como indutores do meio de cultivo para as três cepas: *Bacillus subtilis* UFPEDA 16, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus* utilizando caldo de cana como fonte de carbono. O parâmetro avaliado para identificar a produção de biossurfactante foi o índice de emulsificação. Na Figura 1 estão dispostos os resultados de percentual de emulsificação obtido para a cepa *B. subtilis* UFPEDA 16 ao longo das 96 h de cultivo.

Figura 1- Índice de emulsificação para os indutores propostos utilizando a cepa *B. subtilis* UFPEDA 16

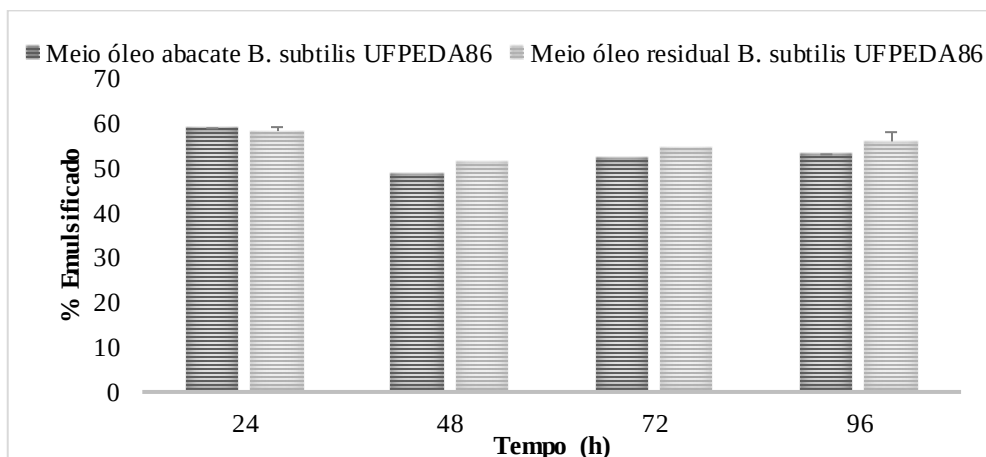


Fonte: Autora

Pode-se observar resultados expressivos com relação ao I.E₂₄ para ambos os indutores avaliados nas primeiras 24h do cultivo. Os dados foram avaliados estatisticamente através do *software* Statistica 7.0 utilizando o Teste de Tukey, que faz um comparativo entre as médias obtidas, indicando que o percentual de emulsificação de 57,14 % e 59,41%, para o óleo de abacate e o óleo de soja residual, respectivamente, nas primeiras 24 h se manteve constante até o final do cultivo. Estes resultados demonstram que ambos os indutores ofereceram ótimas condições ao *B. subtilis* UFPEDA 16 para produção de biossurfactante com boa capacidade quanto a produção de emulsificantes. Essa conclusão foi baseada em estudos reportados por Youssef (2004) que para uma emulsificação eficaz, é necessário que seu índice de emulsificação seja superior a 40%.

Na análise utilizando *B. subtilis* UFPEDA 86 que consta na Figura 2, também é observado que esta cepa foi capaz de produzir um bom bioemulsificante, denotando valores semelhantes ao observados para *B. subtilis*16, com 58,82±% e 58,20±0,88% para ambos os indutores propostos. Os percentuais observados durante todo o cultivo também estão dentro dos parâmetros satisfatórios de produção de bioemulsificantes. Os resultados foram submetidos a análise estatística e seus valores apresentaram diferença significativa entre si indicando que o índice de emulsificação não se manteve constante, o que levou a conclusão que o melhor índice de emulsificação obtido foi o das primeiras 24 h.

Figura 2 - Índice de emulsificação para os indutores propostos utilizando a cepa *B. subtilis* UFPEDA 86

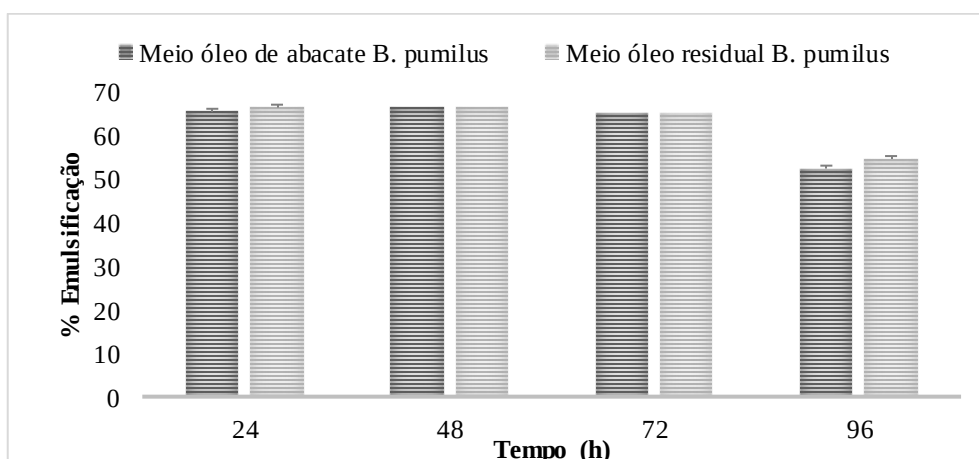


Fonte: Autora

Na Figura 3 observa-se os resultados obtidos para a cepa *B. pumilus* que em 24 h de cultivo apresenta um percentual de emulsificação bem expressivo de $65,21 \pm 0,71\%$ e $66,19 \pm 0,67\%$ no índice de emulsificação que se manteve constante até o tempo de 72 h através da avaliação das médias pelo Teste de Tukey e não apresentaram diferença significativa entre si. Em contrapartida, com 96 h os percentuais de emulsificação reduziram de 12,98 % quando comparados ao tempo de 24h para o meio com óleo de abacate e 11,77% no meio com óleo de soja residual no I.E₂₄, o que resultou em uma diferença significativa quando comparado aos resultados obtidos ao longo do processo fermentativo.

A composição dos meios a partir de diferentes substratos indutores do presente estudo se baseou em estudos prévios realizados sobre os fatores que influenciam na produção de biossurfactantes. O caldo de cana foi escolhido como fonte de carbono devido a autores como Cooper (1981), Makkare Cameotra (1997), Fox e Bala (2000), Reis, Sérvulo e França (2004), Murkhejee e Das (2006), Nitschke e Pastore (2006), Joshi et al. (2008) em seus estudos ao longo dos anos atribuíram aos carboidratos solúveis como sendo importantes na síntese de biotenssoativos, uma vez que promove não só o crescimento do microrganismo, mas a formação de compostos intermediários da via glicolítica, como a glicose6-fosfato, que é um dos principais precursores dos carboidratos presente na porção hidrofílica dos biossurfactantes, como lipopeptídeos que são produzidos por inúmeras espécies de *Bacillus subtilis*, alvo de estudo nesta pesquisa.

Figura 3 - Índice de emulsificação para os indutores propostos utilizando a cepa *B. pumilus*



Fonte: Autora

Bueno, Silva e Cruz (2010) avaliaram as fontes de carbono glicose, sacarose, manitol, caldo de cana, frutose e glicose+ frutose nas concentrações de 1 a 5%, utilizando o *B. pumillus*. Concluíram que a sacarose e caldo de cana na concentração de 2% foram as melhores, apresentando IE de aproximadamente 60% para sacarose e de 45 % para o caldo de cana. Os valores de IE encontrados neste trabalho, usando o caldo de cana, foram maiores para todas as bactérias avaliadas, provavelmente devido as modificações no processo de produção e utilização de óleos como indutores.

Apesar das fontes de carbono solúveis em água serem as principais utilizadas na produção de biossurfactantes, os compostos hidrofóbicos também são utilizados, pois auxiliam a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante (COELHO, 2018). Desta forma, o óleo de abacate e o óleo de soja foram escolhidos como indutores neste processo. Os substratos indutores propostos demonstraram ser eficazes para a produção de bioemulsificantes com alto poder de emulsificação acima de 50% observado nas primeiras 24 h do processo fermentativo. Estes resultados mostram que o biossurfactante obtido pode vir a ser utilizado em processos industriais nos mais diversos setores no papel de bioemulsificantes.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os substratos indutores propostos juntamente com a fonte de carbono demonstraram favorecer a produção de bioemulsificantes nos estudos utilizando as três cepas de *Bacillus*. Os maiores percentuais de emulsificação foram obtidos no início do processo fermentativo com 24h. A cepa de *B. pumilus* indicou uma produção mais expressiva de bioemulsificante quando comparada as demais, apresentando resultados acima de 60% no percentual de emulsificação. Os resultados indicam que o biossurfactante produzido pode vir a ser utilizado como um bom emulsificante em processos industriais devido ao alto poder de emulsificação obtido no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- Al-Bahry, S. N., Al-Wahaibi, Y. M., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Joshi, S. J., Al-Makhmari, H. S., & Al-Sulaimani, H. S. (2013). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.006>
- Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., & Negi, S. (2016). Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource Technology*, 213, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.091>
- Bueno, S. M., Silva, A. N., Garcia-Cruz, C. H. (2010). Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. *Química Nova*, Vol. 33, Nº 7, 1572-1577.
- COELHO, M.A.Z; SANT'ANA, G.C.F; SILVA, K.A. **Produção de Biossurfactante in Microbiologia industrial - bioprocessos**. Cap.15, v. 1, ed.1, Elsevier. Rio de Janeiro, 2018.
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
- Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J. B., & Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(3), 408–412. <https://doi.org/10.1128/aem.42.3.408-412.1981>
- Fox, S. L., & Bala, G. A. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, 75(3), 235–240. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00059-6)
- Heryani, H., & Putra, M. D. (2017). Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (2008). *Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos*. (4th ed.).
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. J. (2008). Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99(1), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.010>
- Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Analytical Chemistry 1959 31 (3), 426–428, 1959.
- Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (1997). Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(1), 37–42. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900349>
- Mouafi, F. E., Abo Elsoud, M. M., & Moharam, M. E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 9, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.12.003>
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509–515.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>

Nitschke, M., & Pastore, G. M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cas sava wastewater. *Bioresource Technology*, 97(2), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044>

Nogueira Felix, A. K., Martins, J. J. L., Lima Almeida, J. G., Giro, M. E. A., Cavalcante, K. F., Maciel Melo, V. M., Loiola Pessoa, O. D., Ponte Rocha, M. V., Rocha Barros Gonçalves, L., & Saraiva de Santiago Aguiar, R. (2019). Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175(July 2018), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>

Produção de cana-de-açúcar no Nordeste. (2018). *DEE- Diário Econômico ETENE*, 181(1), 2. https://www.bnb.gov.br/documents/1342439/4128151/181_06_11_2018.pdf/d1d4290d-1d9e-a214-f50a-9ce50ced36be

Reis, F. A. S. L., Sérvulo, E. F. C., & De França, F. P. (2004). Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 115(1–3), 0899–0912. <https://doi.org/10.1385/abab:115:1-3:0899>

Roy, A. (2018). A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 08(01), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000248>

Sharma, R., Singh, J., & Verma, N. (2020). Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 and *Bacillus subtilis* BR-15. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25(September 2019), 101575. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101575>

Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, 232, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>

Varjani, S. J., Upasani, V. N., de França, Í. W. L., Lima, A. P., Lemos, J. A. M., Lemos, C. G. F., Melo, V. M. M. V., de Sant'ana, H. B., Gonçalves, L. R. B., Rocha, M., Mendes, J., Giro, M., Melo, V. M. M. V., Gonçalves, L. R. B., Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., Negi, S., El-Sheshtawy, H. S., ... Kobisy, A. S. (2015). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 in cashew apple juice using a 24 full factorial experimental design. *Bioresource Technology*, 213(1), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.05.005>

Vasconcelos, N. M. de, Pinto, G. A. S., & Aragão, F. A. de S. (2013). Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. In *Embrapa* (1ª, Vol. 88). Embrapa Agroindústria Tropical.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInemey, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>

5.2 ARTIGO 2

USO DE ÓLEO DE ABACATE NO MEIO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR DUAS CEPAS DE *Bacillus*

RESUMO: Os estudos de otimização do meio de cultivo e dos parâmetros do processo para produção são os primeiros passos comumente utilizados para maximizar o rendimento na produção de biossurfactantes por microrganismos. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo cinético das cepas *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e *Bacillus pumilus*, em meios contendo caldo de cana com e sem adição de óleo de abacate a fim de delinear seu comportamento e sua eficiência na produção de biossurfactante. O processo foi conduzido em erlenmeyers de 1000 mL contendo 610 mL de meio de cultivo. Os experimentos foram conduzidos em mesa agitadora a 200 rpm incubados a 34°C. Na cinética de crescimento foi observado que o meio contendo óleo de abacate favoreceu o desenvolvimento de ambas as cepas de *Bacillus*. Na análise da produção de biossurfactante, o meio contendo óleo de abacate favoreceu uma maior produção do biossurfactante utilizando a cepa *B. pumilus* apresentando um alto percentual de emulsificação de $51,09 \pm 4,24$ % e *B. subtilis* UFPEDA 16 com $49,98 \pm 2,10$ % com 24 h de fermentação. Para os resultados de tensão os maiores percentuais de redução foram obtidos nos meios sem a utilização do óleo com 29,21% em 24 h para *B. subtilis* UFPEDA 16 e 28,89% em 12 h para *B. pumilus*. Todos os resultados obtidos nos meios propostos foram considerados satisfatórios para produção de biossurfactantes e possível aplicações.

Palavras-chave: Tensão superficial; microrganismos; Bioemulsificante.

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes, moléculas de superfície ativa capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos ou entre uma fase líquida e uma fase sólida, são compostos utilizados há muitos anos pelas mais variadas áreas industriais e, que sempre, sintetizados por via química. Entretanto, diante da necessidade de processos industriais e produtos mais sustentáveis, os biossurfactantes começaram a ganhar destaques nos estudos como uma alternativa aos tensoativos sintetizados quimicamente, além de também representarem potencial oportunidade de abertura de novos mercados nas mais diversas aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Inicialmente utilizados como agentes de recuperação de petróleo e emulsificantes, essas biomoléculas possuem aplicações nas mais diversas áreas, devido a sua eficiência definida por sua seletividade e utilização em uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade e por apresentarem baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Varjani & Upasani, 2017; Anjum et al., 2016; França et al., 2015; El-Sheshtawy et al., 2015; Rocha et al., 2014).

Os biossurfactantes representam menos impacto ambiental devido a possibilidade de serem produzidos por via secundária de microrganismos que utilizam para tanto substratos de origem renovável, de baixo custo e que são biodegradáveis e menos tóxicos quando comparado a componentes sintéticos (Peele et al., 2018). Muitos microrganismos são capazes de produzir biossurfactantes, dentre eles atenção especial é dada as bactérias e leveduras. No que diz respeito a bactérias, as do gênero *Bacillus* são as mais citadas devido ao seu potencial em produzir biossurfactantes potentes (Bezerra et al., 2018; Santos et al., 2016). O tipo de biossurfactante produzido por *Bacillus sp.* não apresenta efeitos patogênicos, o que permite assim sua utilização direta em produtos na indústria alimentícia e farmacêutica. O lipopeptídeo produzido por essas cepas possuem extensa atividade de superfície e pode ser isolado em sua forma pura, apresentam atividades antimicrobiana, antiviral e antitumoral. Além disso, possuem diversas propriedades interessantes, tem mostrado atividade promissora de emulsificação e propriedades eficientes de remoção de óleo quando usada como um emulsificante, formação de espuma e características antimicoplasmáticas (Chen et al., 2015; Long et al., 2017; Nogueira Felix et al., 2019).

A produção de biossurfactante não é comercializada em grande escala, devido ao alto custo de produção e recuperação (Mouafiet al., 2016). Atualmente, pesquisas abordam propostas para tornar o processo menos oneroso, como por exemplo, o uso de cepas por tecnologia recombinante ou mutagênese as quais apresentam melhor rendimento, fermentação utilizando de resíduos agroindustriais ou matérias primas de baixo custo como fonte de carbono e otimização de meios (Pereira et al., 2013). Os estudos de otimização do meio de produção e dos parâmetros do processo são os primeiros passos comumente

utilizados para maximizar o rendimento de uma linhagem nativa (Najafi et al., 2010). Entretanto, há muitos fatores a serem considerados que influenciam diretamente a quantidade e natureza do biossurfactante que é produzido por microrganismos, tais como fontes de carbono e nitrogênio, razão de nitrogênio e carbono, concentração de elementos minerais, temperatura, pH, agitação e tamanho do inóculo foram examinados para influenciar criticamente a produção de biossurfactante (Mouafi et al., 2016; Sharma et al., 2017). Neste estudo foram realizados acompanhamentos cinéticos utilizando as cepas de *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e *pumilus*, cultivadas em meio contendo caldo de cana como fonte de carbono e adição ou não de óleo de abacate a fim de delinear seu comportamento e sua eficiência na produção de biossurfactante.

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismos

Foram realizados testes com os microrganismos: *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 cedido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e *Bacillus pumilus* isolado do solo cultivado de cana de açúcar de uma usina da região e cedido pelo Centro de Biotecnologia da UFPB. As culturas foram conservadas em meio Lúria-Bertani composto por ágar (20 g/L), peptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (10 g/L). Os microrganismos foram repicados periodicamente para manter a viabilidade celular, incubados a 37°C por 24h e posteriormente mantidos sob refrigeração a 4°C.

2.2 Padronização do inóculo

O inóculo foi preparado transferindo-se três alçadas da cepa do microrganismo em duplicata para erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL do meio de cultivo composto por caldo de cana (diluído até concentração de açúcares redutores totais de 20 g.L⁻¹), extrato de levedura (1 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹) e K₂HPO₄ (7 g.L⁻¹), previamente esterilizado em autoclave a 105°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. Foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm em intervalos de tempo durante 10 h, a fim de acompanhar o crescimento microbiano e determinar o tempo ótimo de inóculo que se dá em leituras de absorbância entre 0,6 e 0,8 (Farias, 2018).

2.3 Produção de biossurfactante

Foram realizados cultivos para o estudo do comportamento das linhagens em meios com e sem adição de óleo de abacate. A composição de um dos meios foi a mesma do meio de preparação do inóculo e o outro com adição de óleo de abacate (2 g.L⁻¹). Foram utilizados frascos erlenmeyers de 1000 mL, contendo 610 mL de meio previamente esterilizado a 105°C por 15 minutos e inoculado com uma concentração de 10 % (v/v). Após isso, os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm por 48 h. Amostras foram retiradas a cada 2 h até 12 h e após isso a cada 24 h até o fim do cultivo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e sob as mesmas condições de temperatura, agitação, pH e concentração de inóculo. Nestes experimentos foram analisados o crescimento microbiano, o consumo de substrato, pH inicial e final, a porcentagem do índice de emulsificação e a tensão superficial.

2.4 Análises

Nos cultivos para produção de biossurfactante o crescimento microbiano foi analisado pelo método da turbidimetria, para isso foram realizadas medidas da densidade óptica das amostras por meio de um espectrofotômetro na faixa do visível a

um comprimento de onda de 600 nm. Para a determinação da concentração celular em g.L^{-1} foi construída uma curva de calibração que correlacionava a absorbância do meio ao peso seco da amostra (Veloso, 2007).

Para a obtenção do peso seco da amostra foi retirada uma alíquota de 2 mL da suspensão de células obtida a cada 2 h durante as 12 h iniciais de cultivo e após isso a cada 24 h, colocada em tubo previamente seco e pesado, e centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos. Passado esse tempo, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado foi seco em estufa a 105 °C por 24 h. Após isso, o tubo foi resfriado em dessecador por 15 min e pesado. Esse procedimento foi realizado em triplicata. A concentração em g.L^{-1} da amostra foi obtida pela razão da massa final seca (massa de células) em g dividido pelo volume de amostra em L de acordo com a Equação 1 segundo metodologia de Schmidell et al. (2001).

$$\text{Peso seco } (\text{g/L}) = \frac{(\text{mm} + \text{mc}) - \text{mm}}{v} \quad (1)$$

Onde:

mm = Massa do microtubo

mc = Massa de células

v = Volume da amostra

A medida do pH das amostras foi determinada através de medidas diretas em um pHmetro (IAL, 2008) e o consumo de substrato foi avaliado pela medida de açúcares redutores totais (ART) determinada de acordo com o método de DNS, proposto por Miller (1959), adaptado por Vasconcelos et al. (2013).

Para o índice de emulsificação foi utilizado o método descrito por Cooper e Goldberg (1987), onde a razão de amostra:óleo foi reduzida de 4:6 para 2:3. A análise consistiu em misturar 2 mL do sobrenadante do meio livre de células a 3 mL de óleo vegetal, em tubos de ensaio de 10 mL, que posteriormente foram agitados vigorosamente em agitador do tipo vórtex por 2 min e deixados em repouso por 24h. A análise foi realizada em triplicata. O índice de emulsificação foi então determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100 de acordo com a Equação 2 proposta por Wei et al. (2005).

$$IE = \frac{H_E}{H_T} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

I.E = Índice de emulsificação após 24 h

H_E = Altura emulsificada

H_T = Altura total

A tensão superficial do caldo livre de células foi determinada pelo método do anel, usando um Tensiômetro sigma 700 (KSV Instruments LTD - Finland) (SILVA et al., 2014). As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, em triplicata, e o equipamento foi calibrado com água destilada. As análises foram feitas com o sobrenadante obtido após a centrifugação do caldo fermentado das amostras, a uma temperatura de 25°C. A cada início de análise a tensão superficial da água destilada, cujo valor é de aproximadamente 72 mN/m, foi verificada, garantindo a calibração do tensiômetro.

2.5 Obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento

A obtenção dos parâmetros da cinética de crescimento foi realizada segundo o proposto por Schmidell et al. (2001). Os parâmetros cinéticos avaliados foram produtividade em biomassa, velocidade específica de crescimento máxima, tempo de geração, fator de conversão de substrato em biomassa e velocidade média de consumo de substrato, de acordo com as Equações 3, 4, 5, 6 e 7 respectivamente.

$$P_x = \frac{X - X_0}{t} \quad (3)$$

$$\ln X = \mu_{\max} (t - t_i) + \ln X_i \quad (4)$$

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (5)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (6)$$

$$r_s = \frac{(S_0 - S)}{t} \quad (7)$$

Onde: P_x é a produtividade em biomassa, X = concentração final de células, X_0 é a concentração inicial de células e t é o tempo de cultivo em hora; $\mu_{\max}$ = velocidade específica de crescimento máxima, t = tempo final da fase exponencial de crescimento e t_i = tempo inicial da fase exponencial de crescimento; T_g = Tempo de geração; r_s = velocidade média de consumo de substrato; S_0 = a concentração inicial de substrato e S = concentração final de substrato.

2.6 Análise estatística

Os experimentos avaliados com relação as medidas de tensão superficial e índice de emulsificação e os resultados obtidos foram tratados por análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 10%, através do teste de comparação de médias de Tukey, com o auxílio do software Statistica 7.0. Foram analisadas diferenças entre os valores do índice de emulsificação e tensão superficial, a fim de verificar se havia diferença significativa entre a produção do biossurfactante nos meios de cultivo propostos.

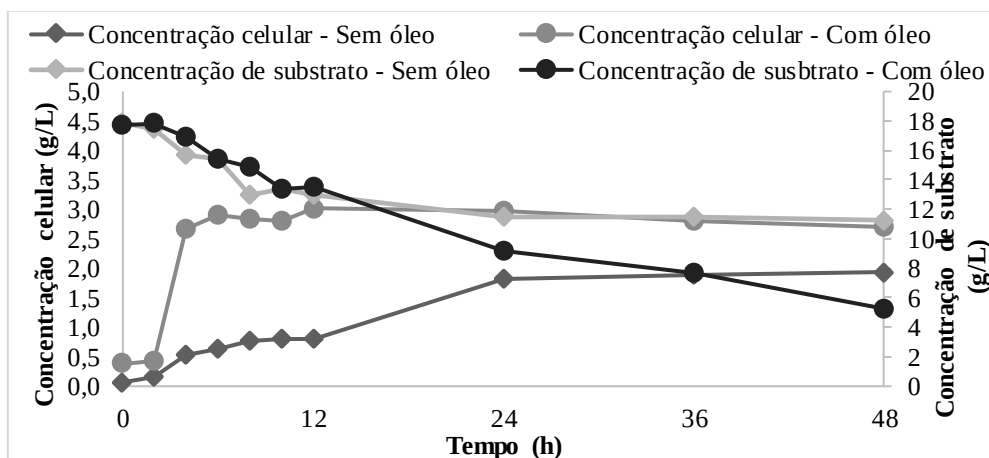
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cinética dos cultivos com *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e *Bacillus pumilus* foi analisada quanto ao crescimento celular, consumo do substrato e variação do pH. Para a avaliação da produção de biossurfactante foi realizado, posteriormente, análises do índice de emulsificação e medidas da tensão superficial para cada cultivo com e sem óleo de abacate.

A Figura 1 descreve a cinética da linhagem de *Bacillus subtilis* UFPEDA16 nos meios com e sem a utilização do óleo de abacate, observa-se o crescimento exponencial do microrganismo de 0 a 24 h, com concentração celular de $1,83 \pm 0,09$ g/L no meio sem a utilização do óleo de abacate, após esse período os valores de crescimento se mantêm praticamente constantes, o que indica o final da fase log, e apresenta concentração celular máxima de $1,94 \pm 0,23$ g/L ao final das 48 h de cultivo. No meio contendo óleo, o microrganismo tem seu crescimento exponencial de 0 a 12 h de processo, com concentração celular máxima de $3,02 \pm 0,19$ g/L, após esse período há um leve decréscimo na concentração celular indicando início da fase estacionária a partir de 24h. No que diz respeito ao consumo de substrato (ART) para o meio sem óleo o consumo total foi de 6,6 g/L, partindo de uma concentração inicial de $17,87 \pm 0,01$ g/L a $11,27 \pm 0,01$ g/L ao final das 48 h de cultivo. Para o meio

contendo óleo de abacate, houve um consumo total de 12,42 g/L de substrato, partindo de uma concentração inicial de $17,69 \pm 0,01$ g/L a $5,27 \pm 0,01$ g/L de substrato ao final do cultivo, o que representou quase o dobro do valor obtido no meio sem óleo.

Figura 1- Cinética de crescimento e consumo de substrato para o *B. subtilis* UFPEDA16 nos meios com e sem o óleo de abacate.

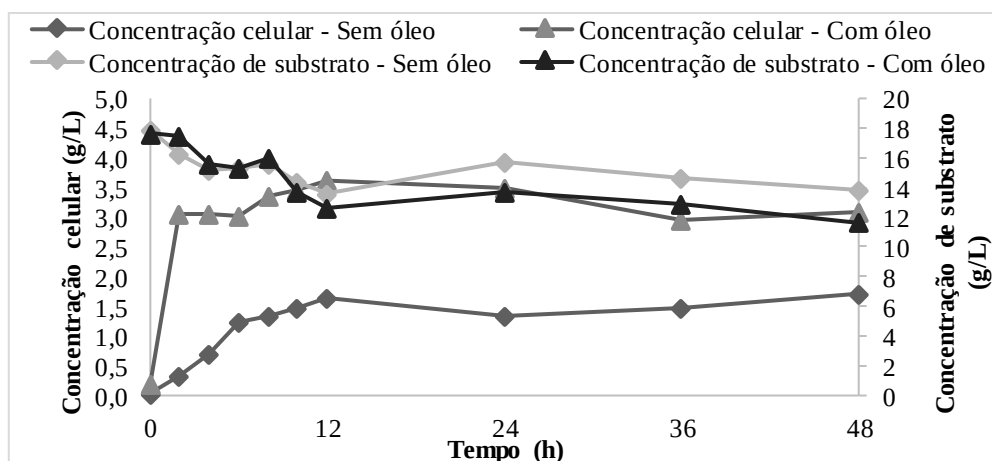


Fonte: Autora

Fazendo um comparativo do comportamento do microrganismo nos meios propostos observa-se que o óleo de abacate favoreceu o aumento da concentração celular, bem como o consumo de substrato. Isso pode ser explicado devido ao óleo de abacate apresentar em sua composição diferentes compostos como ácidos graxos, vitaminas e minerais que podem ter favorecido o crescimento do microrganismo. Segundo Decesaro et al. (2013) microrganismos do gênero *Bacillus* produzem biossurfactantes lipídicos isso faz com que, quando adicionados a um meio contendo óleo, sejam estimulados a produzir lipases que agem sobre o óleo transformando-o em glicerol e ácidos graxos favorecendo não só a biossíntese de glicolipídios de baixo peso molecular, como também o desenvolvimento do microrganismo no meio semelhantemente ao que ocorre nas reações de síntese orgânica de biossurfactantes com lipases.

A Figura 2 apresenta a cinética de crescimento e consumo para a cepa *B. pumilus*, observa-se o crescimento exponencial do microrganismo de 0 a 12 h, no meio sem adição de óleo com uma concentração celular de $1,63 \pm 0,00$ g/L. A concentração máxima de células é de $1,71 \pm 0,00$ g/L, obtida ao final do cultivo de 48h.

Figura 2 - Cinética de crescimento e consumo de substrato para o *B. pumilus* nos meios com e sem o óleo de abacate.



Fonte: Autora

O consumo de substrato total foi de 4,09 g/L, partindo de uma concentração inicial de $17,89 \pm 0,00$ g/L a $13,80 \pm 0,00$ g/L. No meio contendo óleo, o crescimento exponencial do microrganismo ocorreu no período de 0 a 12 h, onde também há sua concentração celular máxima de $3,62 \pm 0,09$ g/L. Houve um consumo de substrato total de 6,05 g/L, partindo de $17,67 \pm 0,01$ g/L a $11,62 \pm 0,01$ g/L.

Ao fazer um comparativo do comportamento do *B. pumilus* em ambos os meios, é possível observar um comportamento semelhante a cepa de *B. subtilis* UFPDA16, ambos os microrganismos tem seu crescimento favorecido no meio contendo óleo de abacate, bem como o consumo de substrato. Entretanto, há uma menor diferença nos resultados expostos para os cultivos utilizando a cepa *B. pumilus*, com um menor consumo de ART o que indica que os experimentos podem ser conduzidos utilizando uma menor concentração de ART ou limitação do crescimento pela baixa oxigenação ou falta de algum outro nutriente.

Além do acompanhamento cinético de crescimento e consumo de substrato dos microrganismos também foram realizadas medidas de pH a cada 12 h de cultivo a fim de verificar possíveis alterações. O pH inicial dos meios era de $7,13 \pm 0,04$ sendo ao final dos cultivos de $6,62 \pm 0,10$. Embora os meios fossem adicionados de sais, que além de auxiliar na síntese do biosurfactante também funcionam como tamponantes para o meio, observou-se um declínio nos valores de pH nas primeiras 12 h de todos os cultivos quando comparados ao pH inicial. Esse declínio, pode estar associado ao catabolismo dos carboidratos resultando na produção de ácidos que, por sua vez, está diretamente associada ao crescimento celular de alguns microrganismos.

Os parâmetros cinéticos dos cultivos estão apresentados nas Tabela 1 e 2. Nos experimentos tanto para o meio sem óleo quanto com adição de óleo para a cepa *B. subtilis* UFPDA16 a fase exponencial está situada entre 0 e 12h. Para o meio sem óleo a produtividade em biomassa foi de 0,0612 g/L.h e com óleo de 0,2203 g/L.h, como mostrado na Tabela 1, essa diferença se deve a presença do óleo no meio que favoreceu de forma expressiva o crescimento do microrganismo e também é observada no parâmetro de rendimento de substrato em biomassa que foi de 0,1530 gc/gs e 0,6246 gc/gs e na velocidade de consumo de substrato de 0,4042 g/L.h e 0,3525 g/L.h para os meios sem e com óleo, respectivamente, indicando um maior rendimento e maior consumo de substrato no meio com óleo. A velocidade máxima específica de crescimento foi de $0,4007 \text{ h}^{-1}$ e $0,4039 \text{ h}^{-1}$ para os meios sem e com óleo, respectivamente, esses valores são bem aproximados e indicam que o microrganismo se adaptou aos meios de forma semelhante e isso também pode ser observado a partir do tempo de geração que foi 1,73 h para ambos os meios. Esses resultados indicam que apesar da cepa *B. subtilis* UFPDA16 ter o crescimento favorecido no meio com óleo, os outros parâmetros indicam que o microrganismo teve a mesma adaptação em ambos os meios.

Tabela 1 - Parâmetros cinéticos para *B. subtilis* UFPEDA 16 nos meios com e sem óleo de abacate.

Parâmetros cinéticos	Meio sem óleo	Meio com óleo
$P_x(\text{g/L.h})$	0,0612	0,2203
$Y_{x/y}(\text{g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}})$	0,1530	0,6246
$\mu_x(\text{h}^{-1})$	0,4007	0,4039
Tg (h)	1,73	1,73
$r_s(\text{g/L.h})$	0,4042	0,3525

Fonte: Autora

Na Tabela 2 constam os parâmetros cinéticos para *B. pumilus* nos meios sem e com adição de óleo de abacate. A fase exponencial de crescimento do microrganismo em ambos os meios também está situada entre 0 e 12h, entretanto quando comparados ao *B. subtilis*, o *B. pumilus* apresenta maiores diferenças com relação a adaptação do microrganismo aos meios.

Os valores de produtividade em biomassa e rendimento de substrato em biomassa também indicam que a cepa *B. pumilus* teve seu crescimento favorecido no meio com óleo, mas os resultados mostram mais proximidade entre si apresentando valores de 0,1330 g/L.h e 0,2842 g/L.h para produtividade em biomassa e 0,3733 gc/gs e 0,6856 gc/gs para rendimento de substrato em biomassa nos meios sem e com óleo, respectivamente. A velocidade de consumo do substrato é menor no meio sem a presença do óleo com valores de 0,3558 g/L.h quando comparado ao meio com óleo de 0,4267 g/L.h. Para as velocidades máximas específicas de crescimento do microrganismo, observa-se que no meio com óleo o microrganismo se adapta mais rapidamente apresentando valores de 0,6763 h⁻¹ e sem óleo 0,4195 h⁻¹ e isso também é observado no tempo de geração que demonstra valores de 1,65 h e 1,03 h para os meios sem e com óleo, respectivamente, confirmando que o microrganismo também tem sua adaptação ao meio favorecida pela adição do óleo.

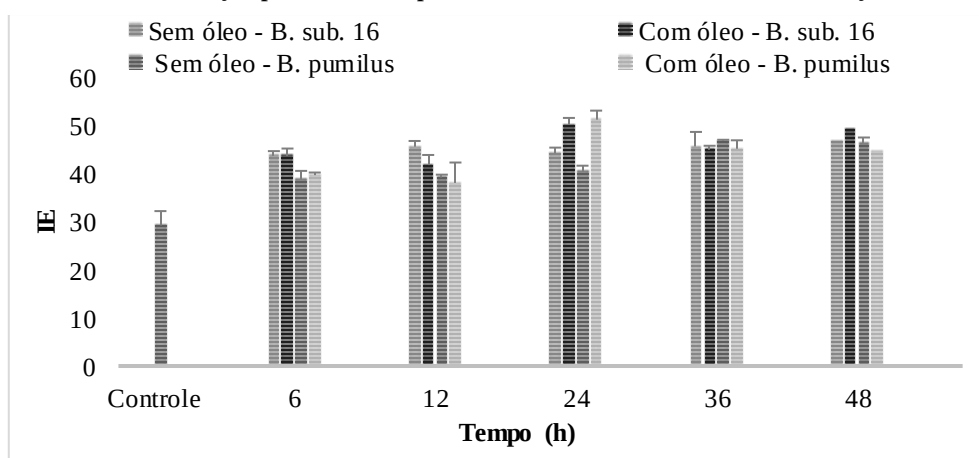
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para *B. pumilus* nos meios com e sem óleo de abacate.

Parâmetros cinéticos	Meio sem óleo	Meio com óleo
$P_x(\text{g/L.h})$	0,1330	0,2842
$Y_{x/y}(\text{g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{substrato}})$	0,3733	0,6856
$\mu_x(\text{h}^{-1})$	0,4195	0,6763
Tg (h)	1,65	1,03
$r_s(\text{g/L.h})$	0,3558	0,4267

Fonte: Autora

O índice de emulsificação constitui um dos principais parâmetros na avaliação da produção de um biossurfactante. O poder de emulsificação, bem como a porcentagem que um determinado meio é emulsionado, indicam a presença ou não desta biomolécula, sua eficiência e estabilidade. A Figura 3 mostra as porcentagens de emulsificação ao longo do cultivo, utilizando as duas cepas de *Bacillus* testadas nos meios com e sem óleo, com um comparativo feito em uma amostra controle do meio sem adição de microrganismos. Todos os experimentos foram analisados utilizando o óleo de soja como componente hidrofóbico na análise do IE.

Figura 3 - Índice de emulsificação para as duas cepas de *Bacillus* nos meios com e sem utilização do óleo de abacate.



Fonte: Autora

Analisando o IE das primeiras 6 h de cultivo para o meio sem utilização do óleo de abacate utilizando a cepa *B. subtilis* UFPDA16 já é possível observar um percentual de emulsificação de $43,56 \pm 3,21\%$, que comparado à amostra controle apresenta um aumento significativo de 14,4%, indicando que já há produção de biossurfactante no cultivo. Ron e Rosenberg, 2001 reportam em seus estudos que a produção de biossurfactante ocorre, em sua maioria, na fase estacionária do crescimento.

e em alguns microrganismos, em que a produção é observada na fase exponencial, a atividade de emulsificação com maior representatividade ocorre na fase estacionária. Tal afirmação é comprovada nos experimentos do meio sem óleo, onde verifica-se o início da produção do biossurfactante nas 12 primeiras h e se mantém constante ao longo do cultivo sem aumento expressivo. Entretanto, no meio com óleo, com 24h se destaca por apresentar um IE de $49,98 \pm 2,10\%$, um percentual bem superior ao encontrado nas primeiras horas de cultivo, indicando sua maior produção no tempo que corresponde o início da fase estacionária para o *B. subtilis* UFPDA16 neste meio, e um aumento de 20,84% quando comparado a amostra controle. Esse percentual sofre uma redução de 5,16% na análise do tempo de 36 h e volta a aumentar para $49,28 \pm 0,82\%$ no tempo final de 48 h de cultivo. O comportamento em ambos os meios é similar apenas nas primeiras 6 h.

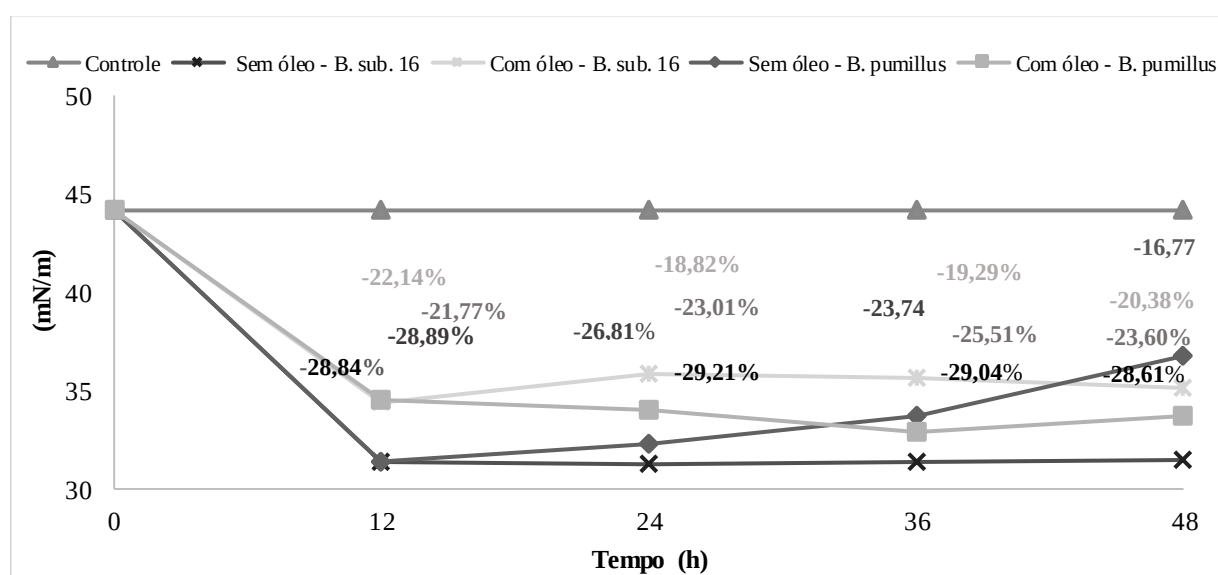
As amostras foram analisadas estatisticamente entre si utilizando o Teste de Tukey a 0,10 de intervalo de confiança. O teste demonstrou que os percentuais do meio sem óleo não diferiram estatisticamente entre si, o que também indica que a porcentagem de emulsificação do meio se manteve constante ao longo do cultivo. Os percentuais do meio com óleo nos tempos de 6 e 12 h não apresentaram diferença significativa entre si, mas foram diferentes dos percentuais de 24 e 48 h. Apenas o resultado de 36 h não foi diferente estatisticamente de nenhuma das amostras. Ao comparar os valores de ambos os meios entre si, os maiores percentuais obtidos nos tempos de 24 e 48 h do meio com óleo de abacate não diferem estatisticamente dos tempos de 12, 36 e 48 h do meio sem óleo, o que indica que a presença do óleo não favorece um aumento significativo na produção do biossurfactante ao longo do processo. Estudos reportados por Yousself (2004) indicam que um índice de emulsificação eficaz deve ser superior a 40% dessa forma é possível afirmar que a adição ou não do óleo de abacate aos meios favorece a produção de um biossurfactante com boa capacidade de emulsificação.

Para a cepa de *B. pumilus* no meio sem óleo há um aumento de 9,51 nas primeiras 6h da fermentação quando comparada a amostra controle. Este aumento indica o início da produção do biossurfactante no meio, que acontece na fase exponencial do microrganismo, de forma similar ao que foi observado para a cepa de *B. subtilis* UFPDA 16 diferindo deste apenas no percentual emulsificado obtido. Nos tempos de 12 e 24 h há um aumento discreto no IE, indicando que a produção se mantém praticamente constante. A partir de 36 h o percentual de emulsificação é de 46,77, representando um aumento de 17,63% quando comparado a amostra controle e permanece constante até o final das 48 h do processo. Para o meio com óleo o comportamento é semelhante ao resultado descrito anteriormente, o percentual de emulsificação tem um aumento considerável de 10,44% nas primeiras 6 h, permanece praticamente constante até 24 h de processo, quando o microrganismo inicia a fase estacionária e observa-se um aumento expressivo de 51,09 no IE o que representa um aumento de 21,95% quando comparado a amostra controle. É possível observar que esse aumento não se manteve até o final do cultivo, o que pode ser explicado devido a produção de outros metabolitos secundários no meio que ocorrem na fase estacionária e que possivelmente prejudicam a capacidade de emulsificação do biossurfactante presente no meio.

As amostras também foram analisadas estatisticamente entre si utilizando o Teste de Tukey a 90% de intervalo de confiança. Para o meio sem óleo o teste não apresentou diferença significativa entre as amostras de 6, 12 e 24 h indicando que a produção do biossurfactante permaneceu constante até o final da fase exponencial. As amostras dos tempos de 36 e 48 h foram estatisticamente diferentes das anteriores, porém não apresentaram diferença estatística entre si, demonstrando que a quantidade de biossurfactante no meio atinge seu valor máximo no início da fase estacionária e se mantém constante até o final do processo. Os resultados para o meio com óleo se mostraram semelhantes nas primeiras 12 h, nas quais o percentual de emulsificação se manteve constante não apresentando diferença significativa entre as amostras. A amostra de 24h, como já é observado a partir do aumento do percentual de emulsificação, apresentou diferença significativa quando comparada as demais, já as amostras de 36 e 48 h não apresentaram diferenças significativas entre si. Quando comparados o comportamento de ambos os meios apresentam diferenças significativas nas amostras de 24 h, e são estatisticamente iguais nas primeiras 12 h e ao final do cultivo. O meio contendo óleo de abacate favoreceu uma maior produção do biossurfactante utilizando a cepa *B.pumilus* apresentando um alto percentual de emulsificação de $51,09 \pm 4,24\%$. Entretanto, a composição de ambos os meios favorece a produção de um biossurfactante com boa capacidade de emulsificação.

A Figura 4 apresenta as medidas de tensão superficial realizadas nos meios com e sem óleo de abacate testados para as duas cepas de *Bacillus* e seus respectivos percentuais de redução. Para fins de comparação o meio puro sem células foi utilizado como amostra controle com uma medida de TS de $44,16 \pm 0,24$ (mN/m). Os resultados obtidos para a cepa *B. subtilis* UFPDA16 demonstraram que em 12 h o meio sem óleo apresenta uma tensão de $31,42 \pm 0,59$ (mN/m), quando comparado a amostra controle representa um percentual de redução de 28,84% indicando a presença de biossurfactante no meio. O percentual de redução se mantém constante ao longo do processo, atingindo seu percentual máximo de redução de 29,21% em 24h, apresentando uma tensão de $31,26 \pm 0,20$ (mN/m). No meio com óleo o percentual de redução máximo foi de 22,14% quando comparado a amostra controle. Este resultado, diferente do que é observado anteriormente, não se mantém constante ao longo do processo fermentativo. A TS do meio aumenta para $35,85 \pm 0,69$ em 24h e volta a diminuir nas amostras de 36 e 48h aproximando-se do percentual de redução inicial com 20,38% ao final do processo fermentativo.

Figura 4 - Medidas de tensão superficial nos meios com e sem óleo de abacate utilizando as duas cepas de *Bacillus*.



Fonte: Autora

O meio sem óleo, para a cepa de *B. pumilus*, denota comportamento semelhante ao obtido para *B. subtilis* UFPDA16, o maior percentual de redução é observado nas primeiras 12 h de cultivo, com 28,89%, entretanto ao longo do experimento a TS do meio não se mantém constante, fazendo com que os percentuais decresçam apresentando valores de 26,81%, 23,74% e 16,77%. No meio utilizando óleo de abacate o comportamento observado nos percentuais de redução de tensão é crescente, inicialmente com 12 h a TS é de $34,54 \pm 0,92$ (mN/m) representando um percentual de 21,77%, em 24h o esse valor aumenta para 23,01% e com 36h o percentual de redução de tensão máximo de 25,51% é atingido, e ao final do cultivo se assemelha ao tempo de 24h, com 23,60%. As flutuações nas medidas de tensão podem ser explicadas devido ao método de filtragem das amostras que é empregado a fim de diminuir o erro de leitura no tensiômetro, esse processo pode ter resultado na perda de produto visto que no meio contendo óleo o biossurfactante pode ter se aderido ao óleo e células e no meio sem óleo pode ter se aderido as células.

Diante dos resultados observados pode-se afirmar que as cepas de *Bacillus* em ambos os meios em que foram testadas produzem um biossurfactante com boa capacidade de redução de tensão. Tal afirmação é relatada por Rahman et al. (2019) em seus estudos reportam que um biossurfactante classificado como bom redutor de tensão é aquele que reduz pelo menos 20 % da tensão superficial, neste estudo verificou-se que o biossurfactante produzido reduz a TS a valores superiores a 20%, logo nas 12h de cultivo.

Os resultados de tensão superficial obtidos por Sharma, Singh e Verma (2017), em seus estudos da produção de biossurfactante utilizando a cepa de *Pseudomona aeruginosa* PBS em meios com extrato de levedura e triptona como fontes de carbono obtiveram valores máximos de redução de tensão de $33,590 \pm 1,811$ (mN/m) e $34,590 \pm 0,116$ (mN/m), valores superiores aos encontrados neste estudo. Felix et al. (2019) utilizando condições de cultivo semelhantes a este estudo em meio mineral contendo suco de caju maçã como fonte de carbono, testou nove diferentes cepas de *Bacillus* e também obtiveram em seus estudos valores de tensão superficial superiores entre $55,2 \pm 1,7$ (mN/m) e $31,9 \pm 0,1$ (mN/m) quando comparadas aos valores obtidos neste trabalho no meio sem adição de óleo utilizando caldo de cana como fonte de carbono. Heryani e Putra (2017) testaram diferentes porcentagens de glicose como fonte de carbono utilizando uma cepa de *Bacillus sp.* denominada BMN27 e também obtiveram valores superiores aos observados neste estudo de 34,3 (mN/m).

De acordo com Sobrinho et al., (2008), os microrganismos produtores de tensoativos podem ser divididos em dois grupos: o primeiro que produz biossurfactante com baixo peso molecular, mas usualmente não são capazes de formar emulsões estáveis e o segundo grupo que produz polímeros que primariamente atuam como estabilizantes de emulsões, mas não afetam a tensão superficial. Tal afirmação, diante dos dados apresentados, não é observada visto que ambos os meios testados para as duas cepas de *Bacillus* produziram um biossurfactante capaz de tanto de produzirem boas emulsões como reduzir a tensão superficial.

Outro ponto que pode ser observado é que o crescimento do microrganismo não é diretamente ligado a produção de biossurfactante, como é mostrado na cinética, o meio sem óleo não favorece tanto o desenvolvimento de ambas as cepas de *Bacillus* quando comparado ao meio com óleo no qual o crescimento é duas vezes mais favorecido, mas ainda assim há produção de um biossurfactante eficiente. Para os meios contendo óleo Amaral et al., (2006) sugere que a solubilização de substratos insolúveis em água pode ser favorecida através da produção de bioemulsionantes que aumentam e, conseqüentemente, facilitam o transporte de nutrientes para os microrganismos. Quanto maior o estresse cisalhante, maior a excreção de biossurfactantes já que o tempo de contato das gotas da fase orgânica, dispersas em água, com os microrganismos se torna mais difícil. O que é observado, principalmente, para a cepa de *B. subtilis* UFPEDA16 é um desenvolvimento maior do microrganismo no meio com óleo e atinge maiores percentuais de emulsificação mantendo sua estabilidade até o final do cultivo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da cinética de crescimento celular demonstrou que as cepas de *Bacillus* apresentaram comportamentos bem semelhantes no que diz respeito ao crescimento nos meios com e sem óleo de abacate. O óleo de abacate favoreceu de forma expressiva o consumo de açúcares e o crescimento dos microrganismos quando comparado ao meio sem óleo. Com relação a produção de biossurfactante foi possível observar também comportamento similar nos testes de índice de emulsificação nos meios com e sem óleo de abacate, tendo o óleo de abacate favorecido a emulsificação nos testes de ambas as cepas que apresentaram resultados satisfatórios de 49,97% e 51,09%, para *B. subtilis* UFPEDA16 e *B. Pumilus*, respectivamente. Os testes de tensão superficial demonstraram também resultados bastante promissores, com boas reduções de tensão para ambas as cepas a partir das primeiras 12 h de cultivo nos meios sem adição de óleo. Diante disso, é possível concluir que os microrganismos são bons produtores de biossurfactante com boa capacidade de emulsionar e reduzir a tensão do meio e apresentam resultados satisfatórios com e sem utilização de óleo de abacate nos meios testados. Os resultados obtidos nos testes com extrato bruto se mostraram muito promissores o que possibilita sua utilização sem a necessidade de um processo de purificação.

REFERENCIAS

- Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., & Negi, S. (2016). Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource Technology*, 213, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.091>
- Bezerra, G. O., Rufino, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2018). Saponins and Microbial Biosurfactants : Potential Raw Materials for the Formulation of Cosmetics. *American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog.*, 34(6), 1482–1493. <https://doi.org/10.1002/btpr.2682>
- Chen, W.-C., Juang, R.-S., & Wei, Y.-H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
- França, Í. W. L., Lima, A. P., Lemos, J. A. M., Lemos, C. G. F., Melo, V. M. M., de Sant'ana, H. B., & Gonçalves, L. R. B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, 255, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- Decesaro, A., Rigon, M. R., Thomé, A., & Colla, L. M. (2013). Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, 36(7), 947–954. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000700005>
- El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., & Kobisy, A. S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.05.005>
- Farias, P. S. (2018). *Produção de biossurfactantes a partir de linhagens de Bacillus safensis e Bacillus subtilis utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato*. Universidade Federal da Paraíba.
- Heryani, H., & Putra, M. D. (2017). Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (2008). *Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos*. (4th ed.).
- Long, X., He, N., He, Y., Jiang, J., & Wu, T. (2017). Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. *Bioresource Technology*, 241, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.120>
- Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Analytical Chemistry 1959 31 (3), 426–428 , 1959.
- Mouafi, F. E., Abo Elsoud, M. M., & Moharam, M. E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 9, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.12.003>
- Najafi, A. R., Rahimpour, M. R., Jahanmiri, A. H., Roostaazad, R., Arabian, D., & Ghobadi, Z. (2010). Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. *Chemical Engineering Journal*, 163(3), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.06.044>
- Felix, A. K. N., Martins, J. J. L., Lima Almeida, J. G., Giro, M. E. A., Cavalcante, K. F., Maciel Melo, V. M., Loiola Pessoa, O. D., Ponte Rocha, M. V., Rocha Barros Gonçalves, L., & Saraiva de Santiago Aguiar, R. (2019). Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175(July 2018), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>
- Peele, A., Venkateswarulu, T. C., & Tammineedi, J. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., & Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>
- Rahman, P. K. S. M., Mayat, A., Harvey, J. G. H., Randhawa, K. S., Relph, L. E., & Armstrong, M. C. (2019). Biosurfactants and Bioemulsifiers from Marine Algae. In P. D. Sukla L., Subudhi E. (Ed.), *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment* (pp. 169–188). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2_13
- Rocha, M., Mendes, J., Giro, M., Melo, V., & Gonçalves, L. (2014). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 in cashew apple juice using a 24 full factorial experimental design. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 20(1), 49–58. <https://doi.org/10.2298/CICEQ120518100R>
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Minireview Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3, 229–236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants : Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Schimidell, W., Lima, U. A. L., Aquarone, E., Borzani, W. *Biocologia Industrial – Engenharia bioquímica*. - Vol. 2 – Editora Edgard Blucher, 2001.
- Sharma, R., Singh, J., & Vema, N. (2017). Optimization of rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa* PBS towards application for microbial enhanced oil recovery. *3 Biotech*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1022-0>
- Sharma, R., Singh, J., & Vema, N. (2020). Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 and *Bacillus subtilis* BR-15. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25(September 2019), 101575. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101575>
- Silva, E. J., Silva, N. M. P. R., Rufino, R. D., Luna, J. M., Silva, R. O., Sarubbo, L. A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloid Surface B* 117:36–41, 2014.
- Sobrinho, H. B. S.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Salgueiro, A. A.; Campostakaki, G. M.; Leite, L. F. C.; Sarubbo, L. A. Utilization of two agroindustrial by

products for the reduction of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, n. 33, p. 912-917, 2008.

Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, 232, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>

Vasconcelos, N. M. de, Pinto, G. A. S., & Aragão, F. A. de S. (2013). Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. In *Embrapa* (1ª, Vol. 88). Embrapa Agroindústria Tropical.

Veloso, A. C. Optimização de estratégias de alimentação para identificação de parâmetros de um modelo de *E. coli*. utilização do modelo em monitorização e controlo. Tese de doutorado em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho, Portugal, 249p.2007.

Wei, Y.; Chou, C.; Chang, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. *Bioch. Eng. Jo.*, v. 27, p. 146-154, 2005.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInemey, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>

5.3 ARTIGO 3

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR PROCESSO SEMICONTÍNUO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS BIOMOLÉCULAS

RESUMO: O crescente interesse industrial na melhoria de produção dos biossurfactantes promoveu o aumento na investigação de formas mais eficientes de produzi-lo levando em consideração, principalmente, os altos custos relacionados a sua produção. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o processo semicontínuo (sistema de cortes) na produção de biossurfactantes visando um possível aumento para escala industrial. Os experimentos foram conduzidos em três diferentes percentuais de cortes de 40%, 60% e 80% avaliados quanto a capacidade de formação do bioproduto ao longo do processo fermentativo. A quantidade de bioproduto obtida foi em 48 h apresentando valor máximo de $5,76 \pm 0,56$ g/L no corte de 40%, entretanto quando avaliadas estatisticamente as médias não apresentaram diferenças significativas, indicando que a produção se mantém constante. O maior percentual de emulsificação obtido foi de $52,70 \pm 4,50\%$ no primeiro corte de 60%, nos demais cortes observa-se valores semelhantes de $49,22 \pm 2,91\%$ e $45,28 \pm 1,39\%$ nas amostras de 40% e 60%, respectivamente, no tempo de 48h. Os resultados demonstram bons percentuais de emulsificação durante todo o processo fermentativo, entretanto a amostra de 80% em 72 h apresenta uma redução em sua capacidade de emulsão. Nos ensaios de estabilidade o óleo de algodão possuiu maior afinidade com o biossurfactante produzido no meio indicando boa tolerância a faixa de pH, diferentes % NaCl e altas temperaturas e capacidade de manter emulsões estáveis durante o tempo de 96 h.

1 INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são classificados como moléculas tensoativas que possuem forma análoga aos surfactantes de origem química, possuem a capacidade de misturar fases de polaridades distintas por serem considerados moléculas anfifílicas, que possuem em suas extremidades uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica capazes de formar agregados moleculares ou micelas devido a sua composição, tornando-se adequados para as aplicações industriais que abrangem propriedades como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, solubilização e dispersão de fases (Silva et al., 2017; Fernandes et al., 2017). A capacidade de serem utilizados em diversas aplicações industriais é apenas uma das muitas vantagens desta biomolécula, outras vantagens que podem ser citadas são não toxicidade, atividades extensas de formação de espuma, biodegradabilidade, biodisponibilidade, biocompatibilidade, aceitabilidade ecológica, alta seletividade, eficácia em ambientes extremos como por exemplo utilização em ampla faixa de pH, temperaturas e concentrações salinas (Jimoh e Lin, 2019). Além de disso, podem ser obtidos por várias fontes e sintetizados a partir de bactérias, fungos e leveduras. Por essa razão possuem diferentes estruturas químicas e propriedades particulares (Martins e Martins, 2018).

A comercialização de biossurfactantes tem apresentado tendência de crescimento diante do seu grande potencial de utilização e desenvolvimento. Segundo Vieira et al., (2021) o mercado mundial para biossurfactantes foi de 4,20 bilhões de dólares em 2017, esse mercado pode atingir a marca dos 5,52 bilhões de dólares em 2022, devido principalmente a maior demanda por esse bioproduto ser a do setor de saneantes. Essa informação esta fortemente atrelada as questões da pandemia desencadeada pelo coronavírus SARS-CoV-2, que abriu espaço para uma possibilidade ainda maior de expansão do valor de mercado desses compostos, que pode até exceder a estimativa de valores estimados, pois a mudança de comportamento em todo mundo atrelada as questões de higiene favoreceram um maior uso de produtos deste segmento em todo o mundo. Empresas do setor químico têm demonstrado interesse no desenvolvimento e comercialização de biossurfactantes, aumentando também o número de patentes relacionadas ao mesmo.

Este crescente interesse industrial na melhoria de produção dos biossurfactantes promoveu o aumento na investigação de formas mais eficientes de produzi-lo levando em consideração, principalmente, os altos custos relacionados a sua produção. Já existem diferentes estratégias que podem deixar os custos do processo produtivo menos oneroso, que podem tornar os biossurfactantes economicamente competitivos no cenário atual, dentre elas destacam-se a utilização de sistemas de alto rendimento cepas microbianas obtidas a partir de técnicas de recombinação e mutação, a otimização do processo fermentativo através da utilização de procedimentos estatísticos a fim diminuir a quantidade de experimentos de bancada e, a

mais difundida atualmente, como utilização de fontes renováveis, resíduos agroindustriais e substratos de baixo custo, por contribuírem também com as questões ambientais e a implementação de um sistema integrado de bioprocesso capaz de produzir biossurfactantes e outros produtos de interesse simultaneamente (Jimoh e Lin, 2019; Prado et al, 2019; Singh, Patil e Rale, 2019).

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o processo semicontínuo (sistema de cortes) na produção de biossurfactantes e caracterizar parcialmente essas moléculas, visando uma possível aplicação em processos industriais.

2 METODOLOGIA

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Bacillus pumilus* isolado do solo cultivado de cana de açúcar de uma usina da região e cedido pelo centro de Biotecnologia da UFPB. A cultura foi mantida em Meio Lúria-Bertani composto por ágar (20 g/L), peptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (10 g/L). Os microrganismos foram repicados periodicamente para manter a viabilidade celular, incubados a 37°C por 24h e posteriormente mantidos sob refrigeração a 4°C.

2.2 Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado transferindo-se três alçadas da cepa do microrganismo em duplicata para erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL do meio de cultivo contendo caldo de cana (diluído até concentração de açúcares redutores totais 20 g.L⁻¹), extrato de levedura (1 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹) e K₂HPO₄ (7 g.L⁻¹) previamente esterilizado em autoclave a 105°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. O inóculo foi utilizado ao atingir absorbância desejada entre 0,6 e 0,8 no tempo de 5 h.

2.3 Produção do biossurfactante utilizando sistema de cortes

Experimentos foram realizados utilizando erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 250 mL do mesmo meio de cultivo utilizado na obtenção do inóculo, adicionados de 10 % v/v de inóculo. Para a avaliação do sistema de cortes foram três diferentes proporções: 40, 60 e 80% contendo mesma quantidade de meio inicial e mesma quantidade de inóculo, em duplicata. A cada 24 h foi retirada a proporção indicada, 40, 60 ou 80%, de meio fermentado e adicionado um volume igual de meio de cultivo estéril sem células, os experimentos foram realizados por 72h. Esta metodologia baseia-se no sistema semicontínuo na condução de um processo fermentativo adaptada de Schmidell et al., (2001).

2.4 Separação do biossurfactante

O sobrenadante livre de células foi colocado em frascos previamente pesados juntamente com um volume de etanol absoluto na proporção 1:3 v/v e em seguida mantido em repouso por um dia em uma temperatura de 4 °C. O biossurfactante foi separado por precipitação. Após esse procedimento foi seco em estufa a 45 °C até peso constante. O pellet livre de umidade foi pesado e seu peso seco foi determinado de acordo com a equação utilizada na determinação do peso seco. O experimento foi realizado em duplicata e o biossurfactante obtido foi expresso em g/L.

2.5 Análise da emulsificação

Para análise do índice de emulsificação foi utilizado o método descrito por Cooper e Goldberg (1987), com adaptações. A análise consistiu em misturar 2 mL do sobrenadante do caldo fermentado livre de células a 3 mL de óleo vegetal, em tubos de ensaio de 10 mL, que posteriormente foram agitados vigorosamente em agitador do tipo vórtex por 2 min e deixados em repouso por 24 h. A análise foi realizada em triplicata.

O índice de emulsificação foi então determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100 de acordo com a Equação 1 proposta por Wei et al., (2005).

$$IE = \frac{H_E}{H_T} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

IE= Índice de emulsificação após 24 h

H_E = Altura emulsificada

H_T = Altura total

As atividades emulsificantes óleo em água foram determinadas a partir de metodologia adaptada de Pinto et al., (2009), utilizando o caldo bruto livre de células sem diluição e o semi-purificado diluído em 30 mL de água, para tanto foi realizada uma mistura na proporção 1:1 de 2 mL da amostra e 2 mL de óleo de soja. A mistura foi agitada em agitador tipo vórtex na velocidade máxima por 2 min. Após 60 min de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado óleo/água em espectrofotômetro a 610 nm, calculando-se a atividade emulsificante óleo em água através da Equação 2.

$$AE_{o/a} = (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times D \quad (2)$$

Onde: AE_{o/a} = atividade emulsificante óleo em água (UE); AE_{a/o} = atividade emulsificante água em óleo (UE); Abs amostra = absorbância da emulsão óleo/água; Abs branco = absorbância da amostra diluída; D = diluição da amostra em água.

A atividade emulsificante óleo em água foi definida como a quantidade de biossurfactante necessária para aumentar a absorbância em 1,0 a 610 nm.

2.6 Avaliação da estabilidade do biossurfactante

Foram realizados estudos do efeito de diferentes níveis de salinidade, pH e temperatura no caldo bruto livre de células contendo biossurfactante para tanto foram realizadas análises do índice de emulsificação de acordo com metodologia adaptada de Barros et al., (2008) e Nitschke e Pastore (2005). A emulsificação do biossurfactante foi avaliada medindo a altura da emulsão nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h para todos os experimentos realizados utilizando óleo de soja, coco e algodão. Para a análise da estabilidade térmica, o meio de cultivo livre de células foi colocado em uma série de tubos de ensaio e submetidos a temperaturas de 40°C, 80°C e 100 °C por 30 minutos em banho maria. Após tratamento térmico, as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente para análise de índice de emulsificação. Para a análise da estabilidade frente ao pH, amostras do meio de cultivo livre de células foram colocadas em uma série de tubos e tiveram seus pHs ajustados para 2, 4, 6, 8 e 10 com um tempo de exposição de 30 minutos. Para a análise da estabilidade frente a força iônica, foram adicionadas diretamente as amostras quantidades de NaCl (p/v) nas concentrações 0,5%, 1%, 2%, 3%, 5% e 10% por um tempo de exposição de 30 minutos. Amostras controles foram preparadas utilizando os óleos testados contendo o caldo bruto livre de células. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

2.7 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada usando o método de disco difusão de acordo com o manual do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) adaptado pela ANVISA. As cepas de patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442 foram crescidas por 24 h a 35 °C, temperatura ótima de crescimento para as cepas utilizadas, em caldo nutriente. Após esse período os microrganismos foram plaqueados em ágar nutriente a fim de se obter colônias isoladas. Três colônias isoladas foram transferidas para um tubo contendo 4 mL de água peptonada 0,1%. Foi preparado um tubo para cada microrganismo estudado em duplicata. Os tubos foram pré-incubados a 35 °C, até o tempo necessário para alcançar a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5 (resultando numa suspensão de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para bactérias). Em seguida com um swab de algodão estéril a suspensão foi plaqueada em placas de Petri de ágar nutriente. Discos estéreis contendo o caldo bruto e o semi purificado do biossurfactante foram colocados em cada placa e após 24 h foi mensurado o halo de inibição. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para o controle positivo foram utilizados os antibióticos ampicilina e levofloxacina e para controle negativo água destilada.

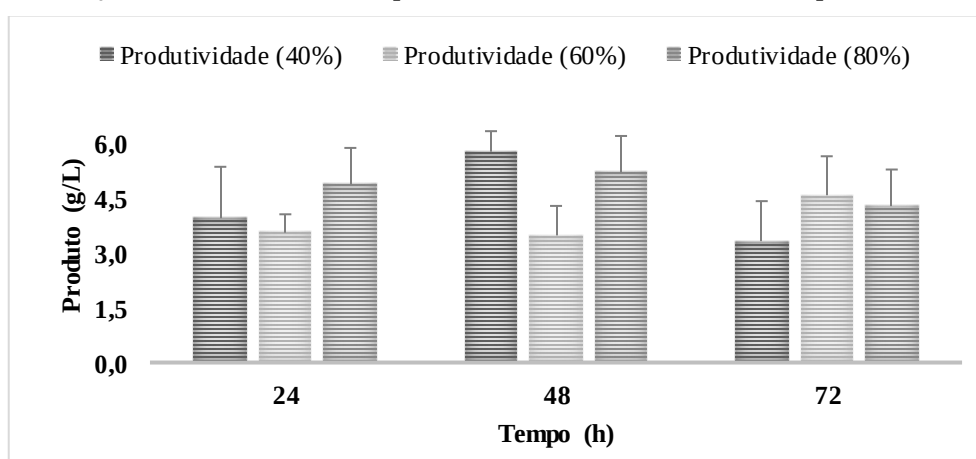
2.8 Análise estatística

Os experimentos realizados foram tratados por análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 5%, através do teste de comparação de médias de Tukey, com o auxílio do software Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da produção do biossurfactante em g/L, são mostrados na Figura 1, contendo os valores de produção ao longo de 72 h de cultivo nas proporções de corte de 40%, 60% e 80%. Os cortes foram realizados a cada 24h de cultivo. Os valores obtidos nas primeiras 24h do primeiro corte foram de $3,94 \pm 1,40$ g/L, $3,54 \pm 0,50$ g/L e $4,86 \pm 1,35$ g/L para as porcentagens de 40%, 60% e 80%, respectivamente.

Figura 1 – Produção do biossurfactante no processo semicontínuo em diferentes percentuais de corte.



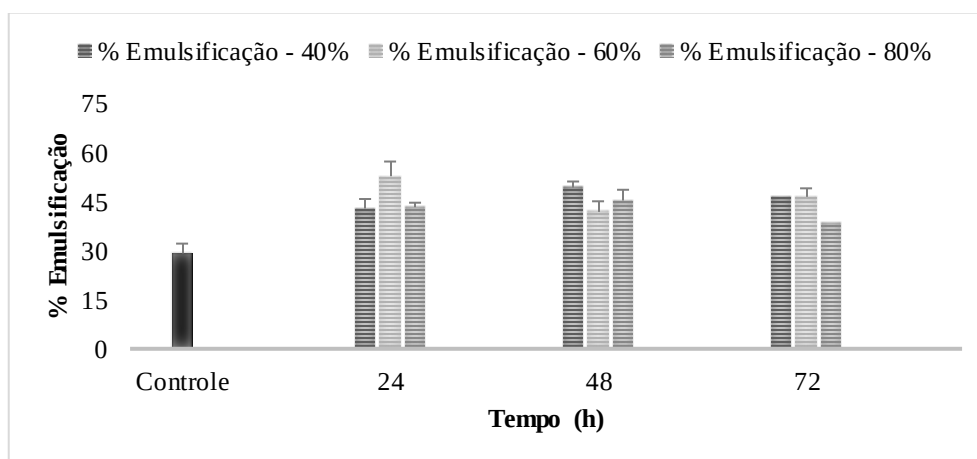
Fonte: Autora

A diferença entre as porcentagens de 40 e 80% pode ser atribuída, principalmente, a quantidade de meio fermentado que é retirada. Os percentuais de 40 e 60% apresentam quantidades de produto semelhantes visto que a diferença entre os cortes é menor. No tempo de 48 h a quantidade de produto é $5,76 \pm 0,56$ g/L no corte de 40% valor bem superior quando comparado aos demais cortes. A produtividade no corte de 80% aumenta um pouco quando comparada a análise das primeiras

24h, já a de 60% se mantém praticamente constante. Na análise dos resultados do terceiro corte do ponto de 72h a produtividade em 40% e 80% sofrem uma queda considerável na produção do bioproduto, já o corte de 60% denota um aumento na produção com valores de $4,57 \pm 1,07$ g/L. Os resultados indicam que a produtividade é pouco afetada nas porcentagens de corte 40 e 80% a partir do terceiro corte. O sistema de cortes, no geral, favoreceu a produção do biossurfactante pela cepa *B. pumilus* e não apresentou diferenças significativas quando comparados entre si no processo nos três cortes analisados.

O teste de emulsificação foi realizado nas três porcentagens de cortes nos tempos de 24, 48 e 72 h, a fim de observar se a porcentagem de emulsificação seria prejudicada a o longo do processo. Os resultados foram comparados a uma amostra do meio puro sem células retirado antes do cultivo denominado controle. Os dados estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Índice de emulsificação obtido da análise do processo semicontínuo na produção de biossurfactante.



Fonte: Autora

Na análise do cultivo com 24h, o percentual de emulsificação dos cortes de 40 e 80% apresentam resultados semelhantes de $42,84 \pm 4,68$ % e $43,23 \pm 2,81$ %, já o corte de 60% apresenta um percentual de emulsificação bem expressivo de $52,70 \pm 4,50$ % representando um aumento de 23,56 % quando comparado ao controle, tal diferença denota que a produção do biossurfactante, embora os meios tenham as mesmas condições inicialmente, apresenta diferenças que podem estar relacionadas a variabilidade do método de análise empregado. Em 48 h do processo observa-se um aumento na porcentagem de emulsificação para os cortes de 40 e 80% de $49,22 \pm 2,91$ % e $45,28 \pm 1,39$ %, respectivamente, já o corte de 60% sofre uma queda de 10,89% quando comparado ao resultado anterior. Nos resultados obtidos do ponto de 72h não é observado diferença entre os cortes de 40 e 60% que apresentam valores de $46,23 \pm 1,88$ % e $46,41 \pm 2,60$ % respectivamente, porém o valor para o corte de 80 % sofre uma queda significativa de 6,73% quando comparado ao segundo corte, indicando que a capacidade de emulsificação do biossurfactante é mais eficaz a partir deste ponto. Assim, para o IE, o sistema de cortes para os percentuais 40 e 60% é eficiente até 72 h de processo, já para o percentual de 80% só é eficiente até 48 h de cultivo.

Além dos testes de índice de emulsificação foram realizadas análises da atividade emulsificante óleo/água do biossurfactante presente no caldo bruto e do semi-purificado apresentados na Tabela 1. Os testes foram comparados a uma amostra controle do meio puro e a atividade emulsificante definida como a quantidade de biossurfactante necessária para aumentar a absorvância em 1,0 apresentada em unidade de emulsão. Foram realizadas leituras da camada emulsionada utilizando três tipos de óleos, após 60 min, e comparadas entre si. Observa-se que no caldo bruto o biossurfactante presente no meio favorece o aumento da absorvância em nove vezes com óleo de soja quando comparada a amostra controle, valor bem superior quando comparadas as emulsões do óleo de coco e algodão. Nos experimentos utilizando o biossurfactante semi purificado a atividade emulsificante demonstra valores bem superiores quando comparados ao caldo bruto e duas vezes maiores nas emulsões formadas com óleo de soja e óleo de algodão quando comparadas a amostra controle. Isso indica que

processos de semi purificação eliminando parcialmente os interferentes presentes no caldo bruto já são eficientes no aumento da capacidade emulsificante. Ambos os resultados obtidos demonstram que o sistema de produção semicontínuo não altera a atividade do biossurfactante presente no meio.

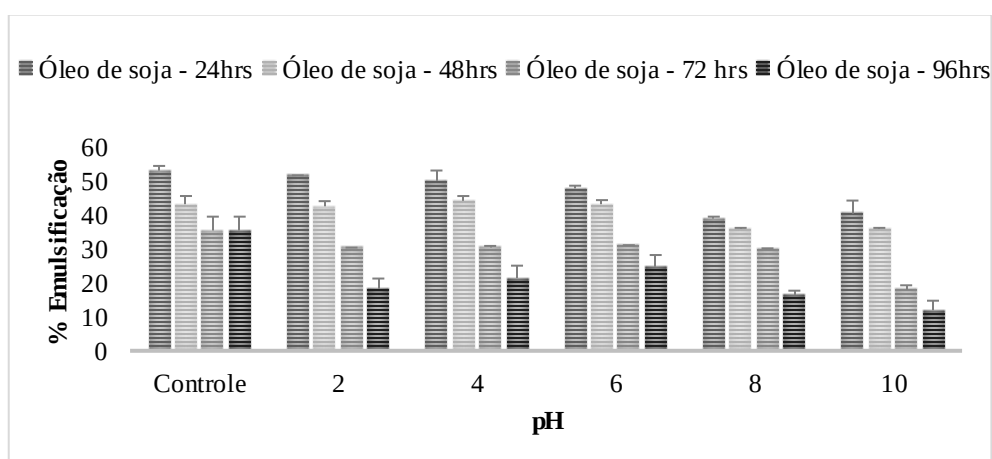
Tabela 1 - Atividade Emulsificante (AE) óleo/água

óleo	AE caldo bruto	AE caldo semipurificado
Controle/soja	0,103	7,26
Soja	$0,93 \pm 0,01$	$15,83 \pm 2,27$
Coco	$0,55 \pm 0,04$	$12,62 \pm 1,68$
Algodão	$0,45 \pm 0,03$	$14,3 \pm 4,01$

Fonte: Autora

Analisando a estabilidade do biossurfactante obtido, as Figuras 3, 4 e 5 apresentam os resultados índice de emulsificação para as faixas de pH testadas nos óleos de soja, coco e algodão, as amostras foram comparadas com a respectiva amostra controle representando o meio fermentativo puro.

Figura 3- Estabilidade de emulsificação em diferentes faixas de pH analisada para óleo de soja



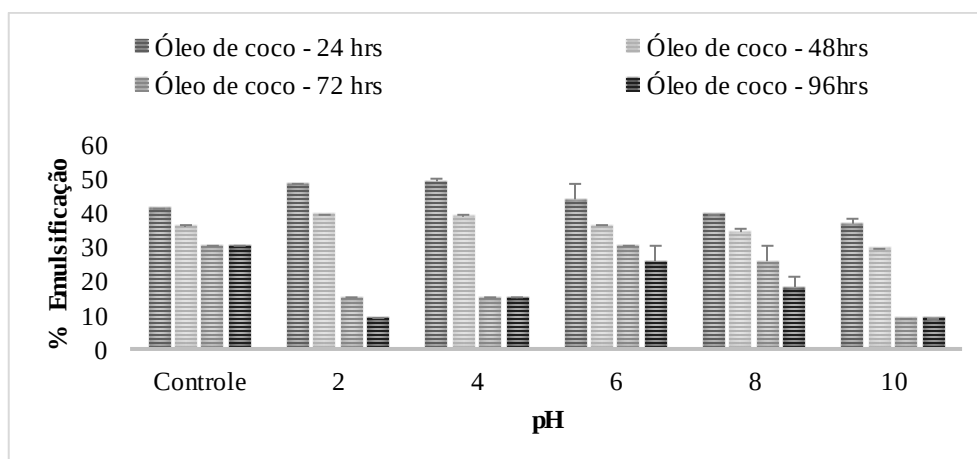
Fonte: Autora

Os percentuais de emulsificação para amostra controle no óleo de soja no tempo de 24h apresentou o valor de $52,90 \pm 1,39$ %, porém esse resultado não se manteve ao longo do experimento sofrendo uma redução 9,86% em 48 h e de 17,58% representando um percentual de emulsificação de $35,32 \pm 4,07$ % em 72 h que se manteve estável até 96 h de experimento. Entretanto, segundo Batista et al., (2006) para ser considerada estável uma emulsão precisa manter 50% do volume da original 24 h depois da sua formação. Quando comparada a amostra controle, os experimentos que sofreram modificações no pH nos valores de 2, 4 e 8 apresentam estabilidade na emulsão até 72 h, e a amostra com pH 6 manteve sua estabilidade de emulsão durante as 96h, entretanto as amostras de pH 4 e 6 quando comparadas não apresentaram diferença significativa entre si até 96h. As médias dos percentuais das amostras foram avaliados estatisticamente e não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre si até o tempo de 72h na faixa de pH 2 a 8. A amostra com pH 10 se mantém estável por 48h e apresenta diferença significativa quando comparada as demais. Em contrapartida as amostras que apresentaram percentuais de emulsificação satisfatórios foram apenas da faixa de pH 2 a 6 até 48h. Os testes realizados com faixa de pH alcalino apresentam valores bem baixos no índice de emulsificação nas primeiras 24h de experimento, quando comparados a amostra controle indicando que o biossurfactante produzido já não se apresenta dentro dos parâmetros citados por Youssself (2004) que indicam um índice de emulsificação eficaz deve ser superior a 40%. Diante do que foi exposto, os resultados indicam que o

biossurfactante presente no meio é capaz de se manter emulsões estáveis nas faixas de pH 2 a 8 até 72h, mas só apresenta valores satisfatórios de emulsificação no óleo de soja em meio ácido até pH 4 em 48h de análise.

Para a análise utilizando óleo de coco na Figura 4, o valor observado no controle apresentou percentual de emulsificação satisfatório apenas nas primeiras 24 h do experimento, entretanto a capacidade de emulsificação embora sofra reduções, ainda assim manteve uma emulsão estável durante as 96 h. Para as amostras de pH 2, 4 e 6 em 24 h, o índice de emulsificação foi favorecido na faixa ácida, aumentando o percentual de emulsificação em 7,3; 8,06 e 2,76 %, respectivamente, quando comparados a amostra controle, apresentando percentuais de $48,48 \pm 0,00$ %, $49,24 \pm 0,76$ % e $43,94 \pm 4,55$ %. Esses percentuais apresentaram reduções fora dos parâmetros considerados bons emulsificantes a partir de 48h, porém suas emulsões se mantiveram estáveis em até 50% do seu volume até 48 h para pH 2 e 4 e durante todo o experimento para pH 6. A faixa de pH alcalino analisada indica percentuais abaixo de 40% já nas primeiras 24 h, mas demonstra estabilidade na emulsão até 72h para pH 8 e até 48 h para pH 10. Tais resultados podem estar relacionados ao tipo de biossurfactante presente no meio que não apresenta afinidade molecular com o óleo de coco, não sendo capaz de produzir emulsão com percentuais considerados satisfatórios. As amostras de pH 2 a 8 não apresentaram diferença significativa entre si quando comparadas até o tempo de 48h.

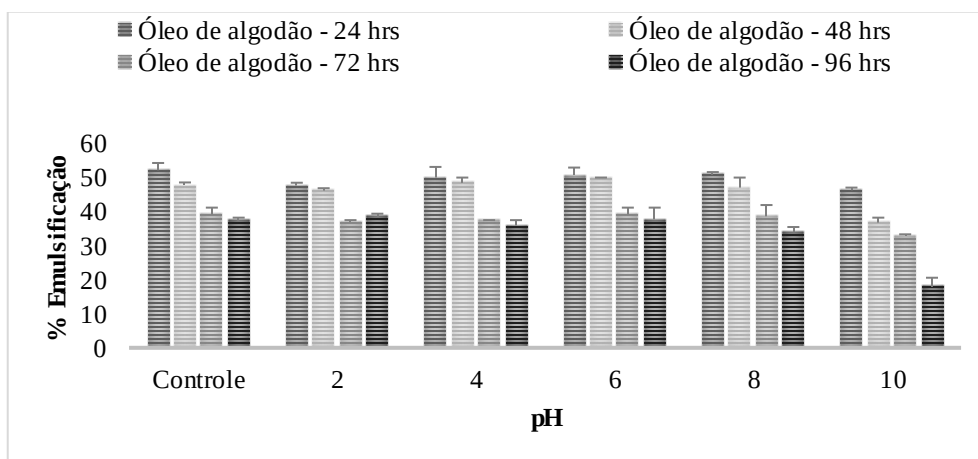
Figura 4- Estabilidade de emulsificação em diferentes faixas de pH analisada para óleo de coco



Fonte: Autora

Na Figura 5 para os testes realizados com óleo de algodão as amostras da faixa de pH 2 a 8 apresentaram emulsões estáveis durante 96 h comparáveis a amostra controle. A amostra com pH 10 apresentou estabilidade apenas até 72h de experimento, perdendo mais que 50% seu volume de emulsão em 96 h quando comparada as demais. Os percentuais de emulsificação em todos os experimentos mostraram valores superiores a 46 % nas primeiras 24 h de análise, entretanto apenas a faixa de pH 2 a 8 indicou percentuais de emulsificação satisfatórios de $46,16 \pm 0,71$ %, $48,44 \pm 1,56$ %, $50,0 \pm 0,00$ % e $47,06 \pm 2,94$ % nos experimentos até 48 h, semelhante ao que é observado na amostra controle. A partir do tempo de 72 h as emulsões apresentaram valores inferiores a 40%, o mesmo analisado na amostra controle o que indica que a alteração do pH até a faixa alcalina observada não interfere na estabilidade e nem na formação das emulsões. Na faixa de pH 10, mais alcalino, os valores denotaram redução em seu percentual abaixo de 40% em 48h sendo o único experimento a apresentar estes valores, indicando que apesar de manter a estabilidade uma alteração no pH a partir deste valor não mantém uma boa emulsão. As amostras quando avaliadas estatisticamente não apresentam diferenças significativas entre si nas faixas de pH 2 a 8 até 96 h.

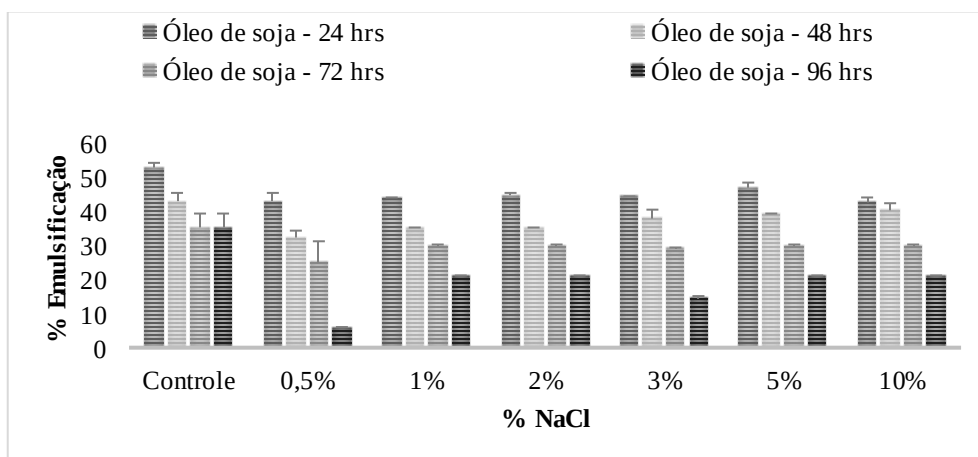
Figura 5 - Estabilidade de emulsificação em diferentes faixas de pH analisada para óleo de algodão



Fonte: Autora

Os experimentos de estabilidade a força iônica com diferentes %NaCl estão apresentados na figura 6, 7 e 8. A estabilidade das emulsões foi analisada no período de 96h e também comparadas a uma amostra controle. Para o óleo de soja, observou-se que todas as amostras com adição de 0,5% a 10% de NaCl apresentaram percentuais de emulsificação acima de 40% de 43,04±2,41%, 44,12±0,00%, 44,79±0,67%, 44,28±0,16%, 46,97±1,52% e 42,65±1,47% durante as primeiras 24h de experimento. A partir de 48h não é mais observado percentuais de emulsificação satisfatórios, entretanto apesar das reduções as emulsões mantêm até 50% de seu volume inicial durante 72h consideradas estáveis até este tempo. Os resultados indicam que mesmo a adição de baixos % NaCl prejudica capacidade do biossurfactante de manter um bom índice de emulsificação no óleo de soja quando comparados a amostra controle. Os percentuais de 0,5 a 10% não apresentam diferença estatística quando comparados entre si até 72h.

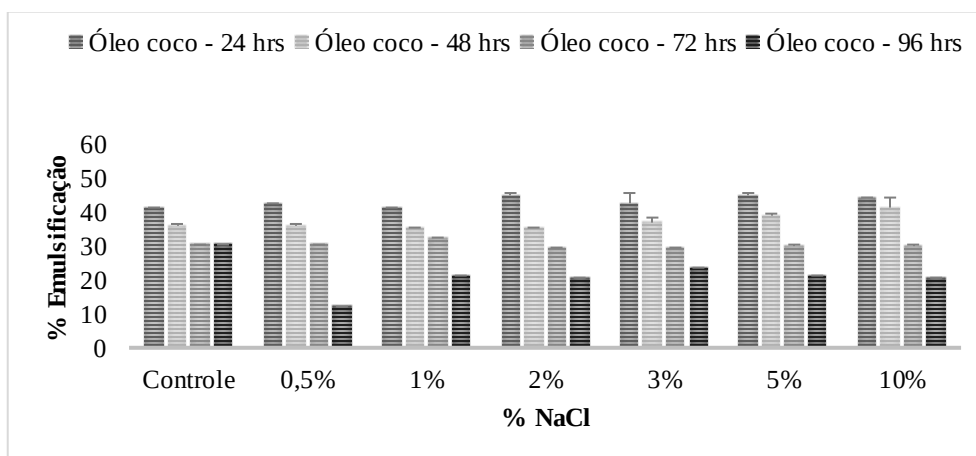
Figura 6 -Estabilidade de emulsificação em diferentes % NaCl analisada para óleo de soja



Fonte: Autora

Na Figura 7 estão representados os valores de estabilidade para óleo de coco, também é possível observar que os percentuais só se mantêm até as primeiras 24h com valores considerados satisfatórios. No entanto, quando comparada a amostra controle também não é observada, após esse tempo, percentuais acima de 40% o que indica que a adição de NaCl não interfere na capacidade emulsificante do biossurfactante presente no meio e sim, como também é observado com relação a mudança do pH das amostras, que possivelmente a forma molecular do mesmo não consegue formar boas emulsões no óleo de coco. Contudo, as emulsões de todas as amostras se mantêm estáveis até 72h e não apresentam diferenças significativas quando comparadas entre si.

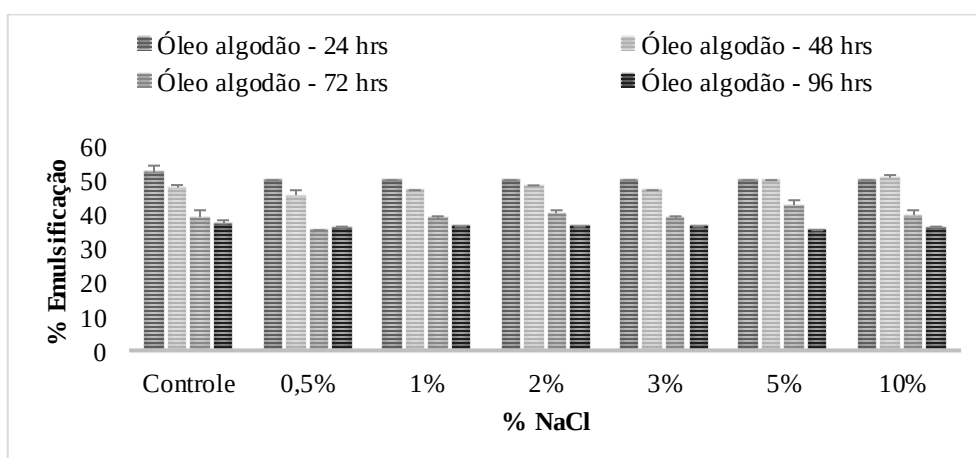
Figura 7 - Estabilidade de emulsificação em diferentes % NaCl analisada para óleo de coco



Fonte: Autora

Na Figura 8, para os experimentos de estabilidade realizados com o óleo de algodão até 48h todas as amostras demonstram percentuais de emulsão acima de 45%, tais valores são comparáveis com a amostra controle. Todas as emulsões foram consideradas estáveis durante as 96h de experimento, pois mantém mais que 50% do seu volume inicial. Os resultados indicam que o biossurfactante presente no meio ainda mantém sua boa capacidade de emulsificação no óleo de algodão com até 10% de adição de NaCl durante, pelo menos, 48h. Os experimentos não apresentam diferença significativa quando comparados estatisticamente entre si.

Figura 8 - Estabilidade de emulsificação em diferentes % NaCl analisada para óleo de algodão

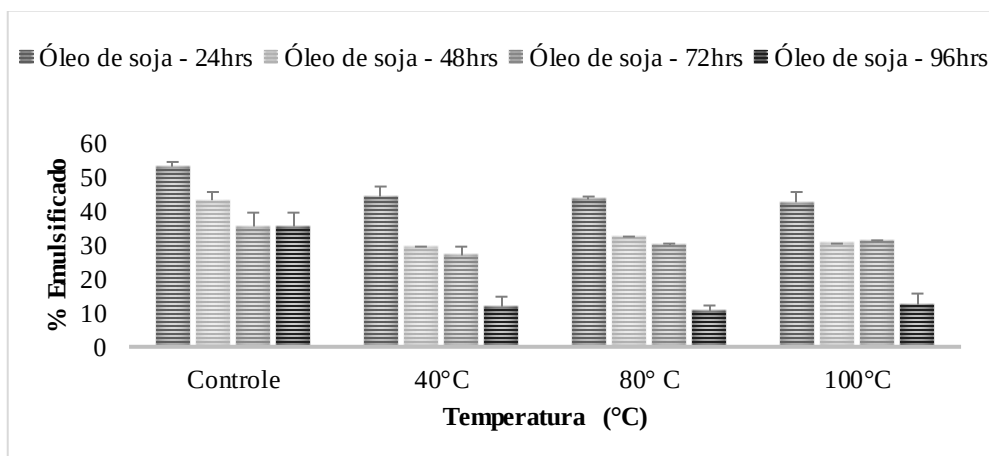


Fonte: Autora

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão apresentados os dados para estabilidade de emulsificação nas três diferentes temperaturas analisadas, de 40, 80 e 100°C durante as 96h de experimento. Os percentuais de emulsificação obtidos com o

óleo de soja que constam na figura 9, indicam que nas primeiras 24h todas as amostras mantêm uma boa capacidade de emulsificação, mesmo sofrendo uma redução quando comparadas ao controle. Esses percentuais não se mantêm ao longo do experimento apresentando valores de $29,41 \pm 0,00\%$, $32,35 \pm 0,00\%$ e $30,30 \pm 0,00\%$ a partir de 48h para as temperaturas de 40°C , 80°C e 100°C , respectivamente. Contudo, com relação a estabilidade observa-se que as emulsões de todos os experimentos se mantêm estável até 72h. Estes resultados indicam que a atividade do BS presente no meio é afetada mesmo em temperaturas mais brandas quando comparadas a amostra controle, perdendo boa parte de sua capacidade emulsificante no óleo de soja após 24h. As amostras de $40, 80$ e 100°C quando comparadas entre si não apresentam diferenças significativas até 96h.

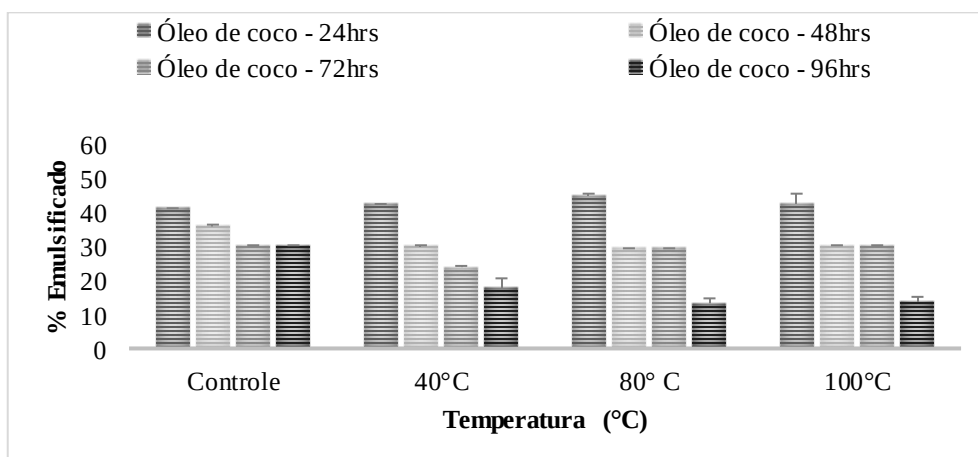
Figura 9 - Estabilidade de emulsificação em diferentes temperaturas analisada para óleo de soja



Fonte: Autora

Para o óleo de coco, na Figura 10, é possível observar o mesmo comportamento obtido com o óleo de soja, os percentuais se mantêm acima de 40% nas primeiras 24h e após esse período há um decréscimo no percentual emulsificado apresentando valores fora da faixa considerada satisfatória, também semelhantes aos encontrados anteriormente a partir de 48h e quando comparados a amostra controle. Com relação aos valores de estabilidade as amostras também mantêm sua estabilidade até 72h. Tais resultados indicam que a atividade do BS presente no meio é afetada mesmo em temperaturas mais brandas quando comparadas a amostra controle, perdendo boa parte de sua capacidade emulsificante no óleo de coco após 24h.

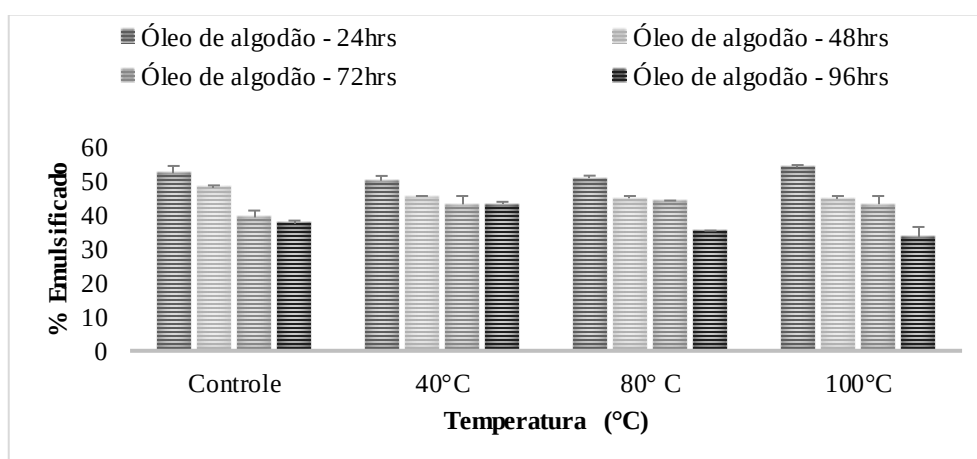
Figura 10 - Estabilidade de emulsificação em diferentes temperaturas analisada para óleo de coco



Fonte: Autora

Na Figura 11, é possível observar que os índices de emulsificação para o óleo de algodão apresentados no experimento T 40°C, conservam boa estabilidade de emulsão mantendo mais de 50% de seu volume inicial e seu percentual de emulsificação acima de 40% até 96h de experimento. Para as demais temperaturas de 80 e 100°C, apesar de também apresentarem altos percentuais de emulsificação, sofrem uma redução de 8,83% e 9,71%, respectivamente a partir da análise de 72h de experimento. A estabilidade de emulsão é mantida durante as 96h podendo ser comparadas a amostra controle. Esses percentuais indicam que a capacidade do BS de emulsionar o meio e manter uma boa emulsão são mantidas mesmo a altas temperaturas quando utilizado o óleo de algodão. As amostras de 40, 80 e 100°C não apresentam diferenças significativas quando comparadas entre si até o tempo de 72h e as amostras de 80 e 100°C não apresentam diferenças significativas entre si até 96h.

Figura 11- Estabilidade de emulsificação em diferentes temperaturas analisada para óleo de algodão



Fonte: Autora

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no corte de 80% no caldo bruto e semi purificado livre de células, nenhum dos experimentos apresentou halo de inibição para as cepas testadas. Uma hipótese a ser considerada para o fato do biossurfactante obtido deste estudo não apresentar atividade antimicrobiana pode estar relacionado ao grau de pureza do mesmo, pois mesmo na análise do semipurificado foi observado um halo de crescimento da cepa *B. pumilus*, o que pode ser um fator limitante na ação do tensoativo. Outra possível explicação pode estar relacionada ao grau de difusão do tensoativo no meio de cultura, que pode ter sido considerado baixo impedindo a formação de um halo de inibição pelos microrganismos testados.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de cortes de até 80% visando o aumento de escala para produção de biossurfactante utilizando a cepa de *Bacillus pumilus* apresentou resultados promissores. A quantidade máxima de bioproduto formada foi de 5,76 g/L no segundo corte na proporção de 40%, entretanto os resultados das demais proporções não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si, dessa forma pode-se afirmar que mesmo na maior proporção de 80% de corte a produção do biossurfactante não é afetada. Os percentuais de emulsificação se mantiveram satisfatórios acima de 40% para todas as proporções avaliadas em até 2 cortes utilizando o processo semicontínuo, indicando que o sistema de corte pode ser usado na produção de biossurfactante. Na análise de estabilidade observou-se que as emulsões formadas com o óleo de algodão mantêm boa estabilidade durante 96 h em todos experimentos e bons percentuais de emulsificação até 48h nas faixas de pH 2 a 8, percentual de NaCl de 0,5 a 10 % e até 72h na faixa de temperatura 40°C a 100 °C o que indica potencial utilização do biossurfactante em diversos setores industriais. Com relação a atividade antimicrobiana apesar dos experimentos não

apresentarem halo de inibição mais testes devem ser feitos utilizando o biossurfactante purificado a fim de eliminar possíveis interferentes que possam ter prejudicado a análise.

REFERÊNCIAS

- 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.; Mounteer, A.H.; Amorim, F.R.; Tótola, M. (2006). Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, 97, 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.020>
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224–229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
- Deepika, K. V., Nagaraju, G. P., & Bramhachari, P. V. (2017). Optimization of Cultural Conditions for Marine Microbial Biosurfactant Production: Future Prospects from Untapped Marine Resources. In *Marine Pollution and Microbial Remediation* (pp. 105–128). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1044-6_7
- Garg, M., Priyanka, & Chatterjee, M. (2018). Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. *Biotechnology Reports*, 18, e00251. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00251>
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Ecotoxicology and Environmental Safety Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184(August), 109607. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
- Martins, P.C., Martins, V.G., 2018. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 127, 10–16.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2008). *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição* (Vol. 23, Issue 1). Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa.
- Nitschke, M. E Pastore, G. M. Production and Properties of a Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown on Cassava Wastewater. *Bioresource Technology*, 97:336–341, 2005.
- Pinto, M. H., Guimarães, R., Alberto, J., & Costa, V. (2009). Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. *Química Nova*, 32(8), 2104–2108.
- P. Singh, Y. Patil, V. R. (2018). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 126, 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
- Prado, A. A. O. S.; Santos, B. L. P.; Vieira, I. M. M.; Ramos, L. C.; Souza, R. R.; Silva, D. P.; Ruzene, D. S. (2019). Evaluation of a new strategy in the elaboration of culture media to produce surfactin from hemicellulosic corn cob liquor. *Biotechnology Reports*, 24, e00364. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00364>
- Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., & Sarubbo, L. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Schimidell, W., Lima, U. A. L.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotechnology Industrial – Engenharia bioquímica*. - Vol. 2 – Editora Edgard Blucher, 2001.
- Silva, F. S. F.; Ferreira, V. C.; Catter, K. M.; Viana, A. P. Q.; Mendonça, K. V.; Sousa, O. V.; Vieira, R. H. F. Produção de biossurfactantes por cepas bacterianas de origem marinha utilizando querosene como fonte de carbono. *Revista de Ciências Ambientais*. Canoas, v. 11, n. 1, 2017.
- Singh, P., Patil, Y., & Rale, V. (2019). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
- Vieira, I. M. M., Santos, B. L. P., Ruzene, D. S., & Silva, D. P. (2021). An overview of current research and developments in biosurfactants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 100, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.017>
- Wei, Yu-Hong; Chou, Chien-Liang; Chang, Jo-Shu. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 2, p. 146-154, 2005.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInemey, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2003.11.001>

6. CONCLUSÕES

Os substratos indutores avaliados, óleo de abacate e óleo de soja residual, juntamente com a o caldo de cana demonstraram favorecer a produção de bioemulsificantes utilizando as cepas de *Bacillus subtilis* UFPEDA16, *B. subtilis* UFPEDA86 e *B. pumilus*.

Os maiores percentuais de emulsificação foram obtidos no início do processo de cultivo com 24 h. A cepa de *B. pumilus* indicou uma produção mais expressiva de bioemulsificante quando comparada as demais, apresentando resultados acima de 60% no percentual de emulsificação.

O estudo da cinética de crescimento celular demonstrou que as cepas de *Bacillus subtilis* UFPEDA16 e *B. pumilus* apresentaram comportamentos bem semelhantes no que diz respeito ao crescimento nos meios com e sem óleo de abacate.

O óleo de abacate favoreceu de forma expressiva o consumo de açúcares e o crescimento dos microrganismos quando comparado ao meio sem óleo. Com relação a produção de biossurfactante foi possível observar também comportamento similar nos testes de índice de emulsificação nos meios com e sem óleo de abacate, tendo o óleo de abacate favorecido a emulsificação nos testes de ambas as cepas que apresentaram resultados satisfatórios de 49,97% e 51,09%, para *B. subtilis* UFPEDA16 e *B. Pumilus*, respectivamente.

Os testes de tensão superficial demonstraram também resultados bastante promissores, com boas reduções de tensão para ambas as cepas a partir das primeiras 12h de cultivo nos meios sem adição de óleo. Diante disso, é possível concluir que os microrganismos são bons produtores de biossurfactante com boa capacidade de emulsionar e reduzir a tensão do meio e apresentam resultados satisfatórios com e sem utilização de óleo de abacate.

Os resultados obtidos nos testes com extrato bruto se mostraram muito promissores o que possibilita sua utilização sem a necessidade de um processo de purificação.

Avaliando o sistema semicontínuo para produção de biossurfactante, o sistema de cortes de até 80%, visando o aumento de escala para produção de biossurfactante utilizando a cepa de *Bacillus pumilus* apresentou resultados promissores.

A quantidade máxima de bioproduto formada foi de 5,76 g/L no segundo corte na proporção de 40%, entretanto os resultados das demais proporções não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si, dessa forma pode-se afirmar que mesmo na maior proporção de 80% de corte a produção do biossurfactante não é afetada.

Os percentuais de emulsificação se mantiveram satisfatórios acima de 40% para todas as proporções avaliadas em até 2 cortes utilizando o processo semicontínuo, indicando que o sistema de corte pode ser usado na produção de biossurfactante.

Na análise de estabilidade observou-se que as emulsões formadas com o óleo de algodão mantêm boa estabilidade durante 96 h em todos experimentos e bons percentuais de emulsificação até 48h nas faixas de pH 2 a 8, percentual de NaCl de 0,5 a 10 % e até 72h na faixa de temperatura 40°C a 100 °C o que indica potencial utilização do biossurfactante em diversos setores industriais.

Com relação a atividade antimicrobiana apesar dos experimentos não apresentarem halo de inibição mais testes devem ser feitos utilizando o biossurfactante purificado a fim de eliminar possíveis interferentes que possam ter prejudicado a análise.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWABA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. **Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 150, ed. 3, p. 305-325, 2008.
- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGA, S.; NABI, A. **Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens***. Desalination, vol. 223, n. 13, p. 143-151, 2008.
- AÇIKEL et al., Cengiz Han. **Health belief model scale for cervical cancer and Pap smear test: psychometric testing**. Journal of advanced nursing, v. 67, n. 2, p. 428-437, 2011.
- AL-AJLANI, M.M.; SHEIKH, M.A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. **Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium**. Microbial Cell Factories, v. 6, n. 17, 2007.
- ALBANO, T.J.S. **Development of production processes for new-to-nature biosurfactantes**. 2014.61f. Dissertação (Mestrado em Engenharia biológica)- Instituto técnico de Lisboa, 2014.
- AL-BAHRY, S.N.; AL-WAHAIBI, Y.M.; ELSHAFIE, A.E.; AL-BEMANI, A.S.; JOSHI, S.J.; AL-AKHMARI, H.S.; AL-SULAIMANI, H.S. **Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 81, p. 141– 146. 2013.
- ALVAREZ, V.M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUESA, J.M.; SOUZA, P.M.; ARAÚJO, L.V.; BARROS, T.G.; SOUZA, R.O.M.A.; FREIRE, D.M.G.F; SELDIN, L. **Bacillus amyloliquefaciens TSBSO 3.8, A biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 136, p. 14 21, 2015. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.046.
- ANISZEWSKI, Erick et al. **Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmiun and zinc from hazardous industrial residue**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 1, p. 235-245, 2010.
- ANTUNES, A.A. **Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de *chromobacterium violaceum* em meios alternativos e de baixo custo**. Tese (doutorado) Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.221 f
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. **Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation**. Biochemistry and Biophysics Research Communication, v. 31, p 488-494. 1968.
- ASCI, Y., NURBAS, M, AND ACIKEL, Y.S. (2010.) **Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metals ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant**. J. Environ Manage 91,724-731.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. **Microbial biosurfactants production, applications**. Application of Microbiology Biotechnology, v. 87, p. 427–444.2010.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades Emulsificantes e Estabilidade do Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* Manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 979-985, 2008.

BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P., MARÓSTICA, M. R., PASTORE, G. M. **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos**. Química Nova, 30(2), 409, 2007.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical Structure, Surface Properties and Biological Activities of the Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from Soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 85, p. 1-8, 2004.

BERASATEGI, I.; BARRIUSO, B.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 439–446, 2012.

BIONE, A. P. M. **Produção de biossurfactante por *Syncephalastrum racemosum* UCP 1302 utilizando substratos agroindustriais e monitoramento computadorizado da temperatura**, 2019, 85. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

BOGNOLO, G. **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.

BUGAY, C. **Biosurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Química) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R. **Synthesis of Biosurfactant in Extreme Conditions**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 50, p. 520-529, 1998.

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

CARVALHO, C.O. **Comparação entre Métodos de Extração do Óleo de *mauritia flexuosa* L.f. (arecaceae - buriti) para o uso Sustentável na Reserva de Desenvolvimento tupé: Rendimento e Atividade Antimicrobiana**. Dissertação (mestrado) Biotecnologia e Recursos Naturais. Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2011.109f

CARRILLO, P.G., MARDARAZ, C., PITTA-ALVAREZ, S. J., GIULIETTI, A. M. **Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria**. World Journal of Microbiology Biotechnology, v. 12, p. 82 – 84. 1996.

CASTRO, M. P. et al. **Influence of several gums on the growth and the production of a bacteriocin like substance from *Lactobacillus curvatus/sakei* ACU1**. Food Control, v. 28, n. 1, p. 52-54, 2012.

CHANDRAN, P.; DAS, N. **Characterization of sophorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil**. International Journal of Science and Nature, v. 2, p. 63-71, 2011.

CHEN, J.C.P.; CHOU, C. **Cane Sugar Handbook**. A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12nd.ed. New York John Wiley & Sons, 1993.

COELHO, M.A.Z; SANT'ANA, G.C.F; SILVA, K.A. **Produção de Biossurfactante in Microbiologia industrial - bioprocessos**. Cap.15, v. 1, ed.1, Elsevier. Rio de Janeiro, 2018.

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

DALTIN, D. **Tensoativos: Química, Propriedades e Aplicações**. São Paulo: Edgar Blucher. 2011.

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 some industrial applications of biosurfactants**. Process Biochemistry, v. 42, ed. 8, p. 1191-1199, 2007.

DECESARO, A. et al. **Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil**. Química Nova, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential**. Microbiol Mol Biol Rev, vol. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DOUROU, M.; PANAGIOTIS, M.; PAPNIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. **Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabelina***. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 101, p. 7213 7226, 2017.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. **Distilery and curd wastes as viable alternative sources for biosurfactant production**. World J Microbiol Biotechnol, vol. 17, n. 1, p. 61-69, 2001.

DURVAL, I.J.B. **Estudo de um biossurfactante produzido por Espécies de *bacillus* isoladas de água do mar e seu potencial para biorremediação de derramamento de petróleo**. Dissertação (mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017. 93p.

FARIA, A.F. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual**. 2010. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

FARIA, A.F.; TEODORO-MARTINEZ, D.S.; BARBOSA, G.N.O.; VAZ, B.G.; SILVA, I.S.; GARCIA J.S.; TÓTOLAC, M.R.; EBERLINB, M.N.; GROSSMAND, M.; ALVES, O.L.; DURRANT, L.R. **Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry**. Process Biochemistry, v. 46, p. 1951–1957. 2011.

FERRASOLI, K. P. **Produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando resíduos do processamento do abacaxi (*Ananas comosus*) como substrato**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, São, Paulo, 2019.

FERREIRA, A.; VECINO, X.; FERREIRA, D.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B.; RODRIGUES, L.R. **Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei***. Colloids Surf B Biointerfaces, v. 155, n.1, p.522-529, 2017.

FILHO, J. W. S; PASOTTO, M.B.; VELASCO, N. D.; OKURA, M. H. **Avaliação do efeito da irradiação micro-ondas no caldo de cana-de-açúcar como tratamento preliminar para produção de açúcar e etanol**. Eclética Química, vol. 40, 16-31, 2015.

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

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

FRANZETTI, A. et al. **Production and applications of trehalose lipid biosurfactants**. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 112, n. 6, p. 617-627, 2010.

GAJEWSKI, A. **A Couple new ways of surface tension determination**. International Journal of Heat and Mass Transfer, v. 115, part b, p.909-917, 2017.

GUIOTTI, O. A. V. **Produção de biossurfactante por *Cutaneotrichosporon mucoïdes* em biorreator a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 97 p. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2009. 149 p.

HERYANI, H., PUTRA, M.D., 2017. **Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp**. Electron. J. Biotechnol. 27, 49–54.

HOROWITZ, S., GILBERT, J. N. E GRI_N, W. M. **Isolation and Characterization of a Surfactant Produced by *Bacillus licheniformis* 86**. Journal of Microbiology, 6:243_248, 1990.

HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O.; KLEBER, H.P. **Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose**. Journal of Biotechnology, v. 33, n. 2, p. 147-155, 1994.

INÊS, M.; DHOUHA, G. **Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity**. Peptides, v. 71, p. 100 112, 2015. doi:10.1016/j.peptides.2015.07.006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - **Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G. E.; MCINNERNEY, M. J.; KNAPP, R. M. **Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2**. Applied Environmental Microbiology, v. 50, ed. 3, p. 698–700, 1985.

JORGE, N. et al. **Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras**. Química Nova, p. 947-951, 2005.

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

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

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

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. **Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4**. Desalination, 2012.

KITAMOTO, D.; TOMA, K.; HATO, M. Glycolipid-based nano materials. In: NALWA, H.S. editor. **Handbook of nanostructured Biomaterials and their Applications in nanobiotechnology**, vol. 1. California: American Science Publishers, p-239-271, 2005.

KOSARIC, N. (Ed.) **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: CRC Press, p. 19-98, 1993.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. **Biosurfactants and biotechnology. Surfactant**. Science Series, v. 25, p. 247-331, 1987.

LOTFABAD, T. B.; SHOURIAN, M.; ROOSTAAZAD, R.; NAJAFABADI, A. R.; ADELZADEH, M. R.; NOGHABI, K. A. **An efficient biosurfactant producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran**. Colloids Surfaces B, vol. 69, n. 2, p. 183-193, 2009.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. **Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids**. International Journal of Cosmetic Science, v. 31, n. 4, p. 255-261, 2009. LIN, Sung-Chyr. Biosurfactants: recent advances. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 66, n. 2, p. 109-120, 1996.

LIU, X.; REN, B.; CHEN, M.; WANG, H.; KOKARE, C.R.; ZHOU, X.; WANG, J.; DAI, H.; SONG, F.; LIU, M.; WANG, J.; WANG, S.; ZHANG, L. **Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H**. Applied microbial and cell physiology, v. 87, p. 1881–1893. 2010.

LUCENA, S. L.; SANTANA, C. C. **Separation of bovine serum albumin and cytochrome C using gas-liquid interface adsorption**. Hungarian J Ind Chem, vol. 28, p. 81-84, 2000.

- MAIER, R. M. **Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria**. In: BENNETT, J.W.; LASKIN, A. I.; GADD, G.M. (Eds). *Advance applied microbiology* – v.52. USA: Academic Press, cap 4. P. 101-121, 2003.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. **An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 58, p. 428-434, 2002.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; IBRAHIM, M.B. **Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production**. *AMB express*, v. 1, n. 5, p. 1-19, 2011.
- MARCHANT, R.; FUNSTON, S.; UZOIGWE, C.; RAHMAN, P.K.S.M.; BANAT, I.M. **Production of biosurfactants from nonpathogenic bacteria**. In: Kosaric, N.; Sukan, F. *Biosurfactants: production and utilization - processes, technologies and economics*. CRC Press, p. 73-81. 2014.
- MAROTTI, B.S. et al. **Screening of species from the genus *penicillium* producing cell bound lipases to be applied in the vegetable oil hydrolysis**. *Química Nova*, v. 40, n. 4, p. 427-435, 2017.
- MARTINS, P.C., MARTINS, V.G., 2018. **Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint**. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 127, 10–16.
- MILLER, G. L., **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Analytical Chemistry** 1959 31 (3), 426-428, 1959.
- MNIF, I. et al. **Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani***. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 6690-6699, dez. 2015.
- MORAIS, K.A.D.; SOARES, R.S.; ARAÚJO, M.V.F.; OLIVEIRA, B.F.R.; VIEIRA, J.D.G. 2015. **Produção de biosurfactante por *Bacillus* sp. em meio mínimo contendo glucose**. *Enciclopédia Biosfera*, 11(22):3884-3894.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. **Towards commercial production of microbial surfactants**. *Trends Biotechnol*, vol. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.
- MULLIGAN, C.N. **Environmental applications for biosurfactants**. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. **Factors influencing the economics of biosurfactants**. In: KOSARIC, N (Ed.), *Biosurfactants, Productions, Properties, Applications*. New York: Marcel Dekker, p. 329-371, 1993
- NERURKAR, A.S. **Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity**. In: Sen, R. (Ed.). *Biosurfactants*. New York: Springer, 2010. p. 304-315. (*Advances in experimental medicine and biology*, v.672).

NETA, N. do A. S. et al. **Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions.** Food Hydrocolloids, v. 27, n. 2, p. 324-331, 2012.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G.; CONTIERO, J. **Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste.** Appl Biochem Biotechnol, vol. 160, n. 7, p. 2066-2074, 2010.

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

NITSCHKE, M. E PASTORE, G. M. **Production and Properties of a Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown on Cassava Wastewater.** Bioresource Technology, 97:336_341, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. **Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater.** Bioresource Technology, v. 97, p. 336-341. 2006.

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

OLIVEIRA, D. W. F., SOUSA, J. R., FRANÇA, W. L., FELIX, K. N., MARTINS, J. J. L., GONÇALVES, L. R. B. **Kinetic Study of Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in Clarified Cashew Apple Juice.** Journal of Biotechnology, v. 101, p. 34-43, 2013.

PANSIRIPAT, S.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; RUJIRAVANIT, R.; KITTYANAN, B.; SOMBOONTHANATE, P.; CHAVADEJ, S. **Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio.** BiochemEng J, vol. 49, n. 2, p. 185-191, 2010.

PARVEEN, J.; SHAJRAT, M.; Md. ZAHANGIR, A.; WAN, M.F.W.N. **Isolation and Selection of New Biosurfactant – Producing Bacteria from Degraded Palm Kernel Cake under Liquid State Fermentation.** Journal of Oleo Science, v. 63, p. 795 - 804, 2014.

PATHAK, K.V.; KEHARIA, H. **Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR).** 3 Biotech, v. 4, n. 1, p. 41 48, 2014.doi: 10.1007/s13205-013-0119-3.

PELIZER, L.H.; PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. **Utilização de Resíduos Agroindustriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental.** Journal of Technology Management & Innovation. Vol 2, 2007.

PEREIRA, J. F. B., GUDIÑA, E. J., COSTA, R., VITORINO, R., TEIXEIRA, J. A., COUTINHO, J. A. P., RODRIGUES, L. R. **Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolate towards microbial enhanced oil recovery applications.** Fuel.111:259–268, 2013.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. (2002) **Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials**. Biotechnol. Prog. 18:1277–1281

RAHMAN, P.K.S.M.; GAKPE, E. **Production, characterization and applications of biosurfactants – Review**. Biotechnology, v.7, n.2, p.360-370, 2008.

RAHMAN, P.K.S.M. et al. **Biosurfactants and Bioemulsifiers from Marine Algae**. En The Role of Microalgae in Wastewater Treatment. Springer, Singapore, 2019. p. 169-188.

ROBERTO, S.M. **Remoção de surfactantes em efluentes industriais**. UFSC, 2000.

ROCHA, P.M. **Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 Utilizando Melaço de Cana como Substrato**. Natal: Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, 2017. 116 p. Tese (Doutorado).

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

ROVINA, F.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. **Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis***. Scientia Plena, v. 14, n. 4, 2018.

RUFINO, R. D. et al. **Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica***. Journal of industrial microbiology & biotechnology, v. 35, n. 8, p. 907-914, 2008.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M., SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.J. **Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 84, p 1 – 5. 2011.

RUFINO, R. et al. **Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988**. Electronic Journal of Biotechnology, v. 17, n. 1, p. 6-6, 2014.

SACHDEV, Dhara P.; CAMEOTRA, SWARANJITS. **Biosurfactants in agriculture**. *Applied microbiology and biotechnology*. v. 97, n. 3, p. 1005-1016, jan. 2013.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. **Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins**. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 105, p. 168-177, 2015. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.09.004

SANTOS, D.K.F. et al. **Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor**. Journal of Petroleum Science and Engineering, v. 105, p. 43-50, 2013.

SANTOS, A. P. P., SILVA, M. D. S., COSTA, E.V. L. **Biossurfactantes: Uma alternativa para o mercado industrial**. Journal of Social, Technological and Environmental Science, v.5, n.1, jan.-jun. 2016 • p. 88-103.

- SANTOS, D.K.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. **Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century**. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, p. 401. 2016.
- SARIN, S.; SARIN, C. **Production, isolation and application biosurfactant /bioemulsifier by oil contaminated soil isolated Enterobacter cloacae LK5**. Naresuan Univ J, vol. 16, n. 2, p. 113-125, 2008.
- SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica***. Current Microbiology, v. 54, n. 1, p. 68–73, 2007.
- SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. **High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa***. J Chromatogr A, vol. 693, n. 1, p. 7-13, 1995.
- SCHIMIDELL, W., LIMA, U.A.L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial – Engenharia bioquímica**. - Vol. 2 – Editora Edgard Blucher, 2001.
- SEN, R.; SWAMINATHAN, T. **Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin**. Process Biochem, vol. 40, n. 9, p. 2953-2958, 2005.
- SEN, R. **Surfactin: biosynthesis, genetics and potential applications**. In: Sen, R. (Ed.). Biosurfactants. New York: Springer, 2010. p. 316-323. Advances in experimental medicine and biology, v. 672.
- SHARMA, S.C.; JOHARY, P.C. **Amino-acid removal during cane juice clarification**. International Sugar Journal, v.86, n.1021, p.7-11, 1984.
- SHARMA, D.; KALITA, S.; DUARAH, K. **Isolation and Characterization of Bio Surfactant Producing Micro Organisms and to Determine it's in Vitro Antagonistic Activity against Phytopathogenic Fungi**. International Journal of Current Trends in Science and Technology, v. 7, n. 10, p. 20355-20368, 2017.
- SHARMA, R., SINGH, J., VERMA, N., 2018. **Optimization of rhamnolipid production from *Pseudomonas aeruginosa* PBS towards application for microbial enhanced oil recovery**.3 Biotech 8 (1), 20. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1022-0>.
- SHALIGRAM, N. S., SINGHAL, R. S. **Surfactin - A Review**. Food Technology and Biotechnology, 48(2): 119-134. 2010.
- SHEKHAR, Prateek et al. **Integrating quantitative and qualitative research methods to examine student resistance to active learning**. European Journal of Engineering Education. p. 1-13, 2014.
- SILVA, E.J., SILVA, N. M. P. R., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SILVA, R.O., SARUBBO, L.A. **Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil**. Colloid Surface B 117:36–41, 2014.

SILVA, F.S.F.; FERREIRA, V.C.; CATTER, K. M.; VIANA, A.P.Q.; MENDONÇA, K.V.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.F. **Produção de biossurfactantes por cepas bacterianas de origem marinha utilizando querosene como fonte de carbono.** Revista de Ciências Ambientais. Canoas, v. 11, n. 1, 2017.

SILVA, R. K. P. **Seleção de microrganismos e produção de biossurfactantes para utilização na indústria do petróleo.** 2016.

SOARES, D.W.F. **Produção e Caracterização de Biossurfactantes Obtidos por Linhagens de Bacillus sp. Isolados de Estações de Tratamento de Águas Residuais e de Solo de Manguezais (Ceará- Brasil).** Ceará: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará- UFC, 2014. 162 p. Tese (Doutorado).

SOBRINHO, H. B. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; PORTO, A. L. F.; SARUBBO, L. A. **Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications.** Recent Developments in Biotechnology, 1st ed.; Houston: Studium Press LLC, v 11, p. 1–29. 2013a.

SOETAERT, Wim. **Introduction to Biosurfactants.** Berlim, Biosurfactants workshop - BioTic, 2014.

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

TANGO, J. S.; TURATTI, J. M. Óleo de abacate. In.: **Abacate: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos.** 2 ed. Campinas: ITAL, 1992. p.156-192.

VALPUESTA, R.R.F. **Otimização da Produção de Biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria-prima Renovável e de Baixo Custo.** Dissertação (mestrado) Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.104p.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; DE ARAGAO, F. A. S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos.** Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2013.

ELOSO, A. C. **Optimização de estratégias de alimentação para identificação de parâmetros de um modelo de E. coli. utilização do modelo em monitorização e controlo.** Tese de doutorado em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho, Portugal, 249p.2007.

WEI, Y.H.; LAI, C.C.; CHANG, J.S. **Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332.** Process Biochemistry, v. 42, ed. 1, p. 40-45, 2007.

YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. **Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater.** Process Biochem, vol. 44, n. 3, p. 302-308, 2009.

YONEDA, T. et al. (inventores). SHOWA DENKO K.K. (cessionário). **Production process of surfactin**. US Patent 2006: 7011969.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGER, K.N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. **Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms**. *Journal Microbiology Methods*, v. 56, p. 339-346, 2004.

ZHANG, J.; XUE, Q.; GAO, H., LAI, H.; WANG, P. **Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery**. *Microbial Cell Factories*, v.15, p. 168- 183, 2016.

ZHENG, C., WANG, M., WANG, Y., HUANG, Z. **Optimization of biosurfactant mediated oil extraction from oil sludge**. *BioresourTechnol* 110:338–342, 2012.