



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

DEBORAH RAMOS MEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO MELANCIA COMO MEIO
DE CULTIVO:**

SÍNTESE EM CEPAS DO MICRORGANISMO *Bacillus pumillus*

JOÃO PESSOA, 2022

DEBORAH RAMOS MEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO MELANCIA COMO MEIO
DE CULTIVO:**

SÍNTESE EM CEPAS DO MICRORGANISMO *Bacillus pumillus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do curso de Engenharia Química
da Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

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

JOÃO PESSOA, 2022

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M514pp Meira, Deborah Ramos.

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE UTILIZANDO MELANCIA COMO
MEIO DE CULTIVO : síntese em cepas do microrganismo b.
pumillus / Deborah Ramos Meira. - João Pessoa, 2022.
32 f. : il.

Orientação: Sharline Florentino de Melo SANTOS.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. biossurfactantes; microrganismo; melancia. I.
SANTOS, Sharline Florentino de Melo. II. Título.

UFPB/BSCT

CDU 66.01(043.2)

DEBORAH RAMOS MEIRA

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE UTILIZANDO MELÂNCIA COMO
MEIO DE CULTIVO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do curso de Engenharia Química
da Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharelem Engenharia Química.

João Pessoa – PB, 15 de dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA



Prof^ª. Dr^ª. Sharline Florentino de Melo Santos
(Orientadora)



Me. Willyan Araújo da Costa
(Examinador)



Me. Maria Helena Juvito da Costa
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, força divina cósmica que me protegeu e me guiou ao longo desse caminho e de toda a minha trajetória.

Agradeço a minha família, em especial à minha mãe, que se preocupou comigo e me ajudou financeiramente a continuar os meus estudos.

Agradeço aos meus professores da graduação e em especial a minha orientadora do TCC, que pacientemente me orientou ao longo dessa pesquisa. Agradeço aos técnicos do laboratório, que me auxiliaram durante as análises.

Agradeço a todos que se esforçam em construir possibilidades melhores de vida e que se preocupam em contribuir positivamente para uma sociedade mais justa para todos.

E por último, agradeço a mim mesma, por não ter desanimado perante as dificuldades e sempre procurar por soluções no lugar de conformidade.

*O universo é a combinação de milhares de elementos, e, contudo, é
expressão de um simples espírito - um caos para os sentidos, um
cosmos para a razão.*

Helena P. Blavatsky

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas de origem microbiana semelhantes às de origem não renovável. Suas estruturas moleculares são anfifílicas pois apresentam uma região lipofílica (apolar) e outra região hidrofílica (polar), formam agregados globulares conhecidos como micelas em presença de líquidos não miscíveis entre si. Apresentam funções de emulsificação e são aplicadas em diversas áreas industriais, como por exemplo indústrias farmacêuticas, alimentícias, de saneantes bem como biorremediadores em desastres associados ao derramamento de petróleo. Suas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos estão em fornecerem alternativas ecológicas evitando assim a intoxicação do meio aplicado e apresentam melhores desempenhos em variações bruscas de temperatura, pH e salinidade do meio. A sua sintetização e comercialização em larga escala encontra empecilho no custo de produção, uma vez que reagentes onerosos são empregados como fontes de nutrientes. Em vista disso, o presente trabalho desenvolveu estudos objetivando à análise de substrato indutor contendo suco de melancia, um fruto regionalmente acessível e de custo baixo, para o crescimento de *Bacillus pumilus*, uma bactéria de cepas de *Bacillus* que demonstram proeminência na produção de bioemulsificantes. O desenvolvimento de *B. pumilus* no presente trabalho apresentou resultados favoráveis nas primeiras 48h para a produção de bioemulsificantes, com destaque nas primeiras 24h onde o índice de emulsificação foi de 50% nas primeiras 24 horas de cultivo.

Palavras-chave: biossurfactantes; microrganismo; melancia.

ABSTRACT

Biosurfactants are molecules from microbial origin similar to those of non renewable resources. Their molecules are amphiphilic because they have a lipophilic (apolar) region and another hydrophilic (polar) region, forming globular aggregates known as micelles in the presence of non-miscible liquids. They present emulsification functions and are applied in several industrial areas, such as pharmaceutical, food, sanitizing industries as well as bioremediators in disasters associated with oil spills. Their advantages in relation to synthetic surfactants are that they provide ecological alternatives, thus avoiding the intoxication of the applied medium and they present better performances in enormous variation of temperature, pH and salinity of the medium. Their synthesis and commercialization on a large scale is hampered by the cost of production, since expensive substrates are used as sources of nutrients. Regarding this, the present research aims in the analysis of an inducer substrate containing watermelon juice, a regionally accessible and low-cost fruit, for the growth of *Bacillus pumilus*, a marine bacterium of *Bacillus* strains that demonstrate prominence in the production of bioemulsifiers. The development of *B. pumilus* in the present study showed favorable results in the first 48h for the production of bioemulsifiers and especially at 24h of cultivation occurred an expressive decrease in substrate that was approximately 80%.

Key words: Biosurfactants; microorganism; watermelon.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1. BIOSSURFACTANTE.....	14
3.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES E SUAS CARACTERÍSTICAS ...	21
3.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR B. PUMILLUS	23
3.4. MELANCIA	23
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. MICRORGANISMO	25
4.2. PREPARAÇÃO DE INÓCULO	26
4.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	27
4.4. ANÁLISES	27
4.4.1. Análise de emulsificação	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
5.1. Rendimento do suco de melancia.....	28
5.2. Caracterização do suco de melancia.....	28
5.3. Produção de bioemulsificantes e consumo de substrato	29
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração das forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido.....	10
Figura 2: Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida: a) moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas.....	11
Figura 3: Formação de micelas na CMC.....	11
Figura 4: Estruturas químicas de alguns biossurfactantes.....	13
Figura 5: A melancia em uma balança antes de ser cortada e separada suas partes.....	20
Figura 6: O microrganismo <i>B. Pumilus</i> utilizado para o repique.....	21
Figura 7: Inóculo do <i>B. Pumillus</i> no substrato indutor contendo suco de melancia.....	22
Figura 8: Histograma do Índice de Emulsificação ao longo do cultivo de 72h totais.....	25
Figura 9: Consumo de substrato ao longo do cultivo de 72h totais.....	26

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades e vantagens dos biossurfactantes.....	15
Tabela 2: Aplicações e funções industriais dos biossurfactantes.....	16
Tabela 3: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	17
Tabela 4: Rendimento da melancia.....	24
Tabela 5: Características físico-químicas do suco de melancia.....	24
Tabela 6: Valores de caracterização do cultivo a cada 24h, ao longo de 72h.....	25

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas de origem biológica, produzidas por microrganismo como bactérias, fungos e leveduras. São biomoléculas anfífilas, pois apresentam em suas moléculas uma região lipofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), possuem propriedades que reduzem a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos e ou entre uma fase líquida e uma fase sólida. Se apresentam como uma alternativa ecológica aos surfactantes sintéticos oriundos do petróleo, pois oferecem vantagens como a biodegradabilidade, não toxicidade do meio empregado e a capacidade de suportar variações consideráveis de temperatura, pH, pressão, salinidade, força iônica e presença de solventes orgânicos.

Estes compostos conferem propriedades físico-químicas de interesse vasto industrialmente, tais como: a emulsificação, redução da tensão superficial, separação e solubilização de líquidos. Devido a isso, os biossurfactantes podem ser empregados em ramos como a agricultura, indústrias de produtos de higiene, alimentícias, têxteis, construção civil, farmacêutica, entre outras. Entretanto, devido aos altos custos de produção, principalmente nas etapas de isolamento do microrganismo, do uso de substratos para o cultivo e da purificação e separação dos biossurfactantes, sua produção ainda não foi adotada em larga escala industrial.

As moléculas dos biossurfactantes são agentes ativos de superfície ou tensoativos, que funcionam como redutores da energia livre do sistema por reduzir a energia das tensões superficiais e interfaciais através da substituição das moléculas localizadas na superfície e na interface dos líquidos, isso ocorre devido a sua estrutura molecular anfífila. Os biotensoativos se diferenciam entre aquelas de baixo peso molecular e alto peso molecular, os quais, geralmente, os primeiros são conhecidos por reduzirem a tensão superficial e a tensão interfacial entre o óleo e a água. Já os segundos são conhecidos por suas propriedades emulsificantes. As bactérias, juntamente com as arqueobactérias, são os maiores responsáveis pela produção destes compostos; bactérias das famílias *Pseudomonaceae* e *Bacillaceae* são capazes de produzir biossurfactantes eficientes na remoção de petróleo e seus derivados poluentes de água (BUENO; SILVA; CRUZ, 2010).

Em relação ao alto custo de sua produção, segundo (SOUSA et al., 2014), “uma estratégia para minimizar este problema consiste na utilização de substratos oriundos de fontes alternativas, onde se destaca as frutas e os resíduos agroindustriais, de origem renovável e de baixo custo, levando à obtenção de concentrações elevadas de biossurfactantes no meio reacional o que pode baratear em até 50% o custo final de produção”. Com isso, tem-

se a alternativa de utilizar frutas regionais do Norte-Nordeste, que são características por serem ricas fontes de nutrientes, podendo servir eficientemente como substratos de baixo custo, e contribuindo também à fruticultura regional, que tem importante relevância social e econômica para essa região e para o Brasil. Levando em consideração tais afirmações, procurou-se levantar estudos a respeito do suco de melancia e seus resíduos como a casca e a semente da melancia, ambos ricos em glicose, uma fonte valiosa de carbono dentro dos bioprocessos.

A melancia (*Citrullus lanatus*) pertence à família Cucurbitaceae e pode ser considerada terceira fruta mais popular do mundo (Lv et al., 2014). É produzida em áreas livres de longos períodos de gelo e sua utilização é variada, podendo ser na produção de suco, néctar, coquetéis, entre outros (NABAVI-PELESARAEI et al., 2014). No Brasil, em 2013/2014, foram produzidas 2.079.547 toneladas de melancia (IBGE, 2014), enquanto o mundo produziu 106.400.000 toneladas (FIGUEIREDO, 2017). No Brasil, as regiões mais indicadas para o plantio da melancia situam-se no Semiárido Nordeste, nas quais podem ser plantadas em qualquer época do ano (CARVALHO, 1999). A quantidade de melancia produzida no Brasil ocupa o quarto lugar mundial, atrás apenas de China, Peru e Irã, com destaque para a produção nas regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste (FURLANETO E BERTANI, 2015).

Além disso, as propriedades do suco de melancia são estudadas na área de formulação de cosméticos, alimentícia e farmacêutica, pois estima-se que em 100g de bagaço, encontra-se de 3,9 a 7,8 mg de licopeno, um carotenoide com alto poder antioxidante. Avaliando tais propriedades, o presente trabalho objetiva desenvolver moléculas de biossurfactantes em substratos indutores contendo suco de melancia.

A cepa avaliada no presente trabalho foi a *Bacillus pumilus*, levando-se em consideração estudos prévios que avaliaram um bom crescimento microbiano e resultados promissores na função emulsificante dos biossurfactantes provenientes desta. O cultivo demonstrou bons resultados no tempo de 24h para formação de bioemulsificante e utilizando o substrato indutor contendo melancia, nota-se uma produção de biossurfactantes proeminente de interesse para indústrias de cosméticos, farmacêuticas e alimentícias.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de biossurfactantes, por cepas da bactéria *Bacillus pumilus*, utilizando como meio de cultivo suco de melancia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Realizar a extração do suco de melancia;
- ii. Obter o rendimento em casca, sementes e suco;
- iii. Realizar a caracterização físico-química do suco de melancia;
- iv. Realizar o cultivo do *B. pumilus* em meio contendo suco de melancia;
- v. Avaliar a produção de bioemulsificante;

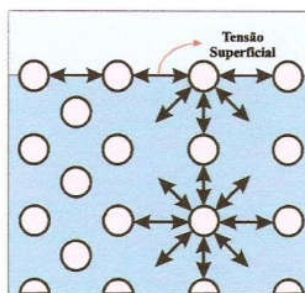
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. BIOSSURFACTANTE

Os biossurfactantes são sintetizados por via microbiana, consistindo no cultivo e na utilização de características de determinados microrganismos como bactérias, fungos e leveduras produtores de biomassa com propriedades de emulsificação. Os biossurfactantes são moléculas anfifílicas, que apresentam superfícies hidrofílicas (apolar) e lipofílicas (polar), eles formam micelas, que são estruturas globulares. Com isso os biossurfactantes são utilizados como inibidores de tensão superficial entre líquidos não miscíveis, exercendo assim função de miscibilidade aos líquidos, exemplo entre óleo e água. Podendo ser utilizados em saneantes e produtos cosméticos, assim como em biorremediações de petróleo em derramamentos nos oceanos.

A tensão superficial se define como uma camada na superfície do líquido que faz com que a superfície se comporte como uma membrana elástica, onde os objetos não conseguem adentrar ou afundar. Tal fenômeno se dá devido às interações entre as moléculas do líquido. As moléculas que se encontram no interior do líquido irão interagir com as demais em todas as direções (em cima, em baixo, dos lados e diagonais). Já aquelas da superfície não apresentam átomos vizinhos acima delas, exibindo assim uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento nas forças de atração intermoleculares na superfície é chamado de tensão superficial dos líquidos (figura 1) (PIRÔLLO, 2006).

Figura 1: Ilustração das forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido (PIRÔLLO, 2006, p. 8)

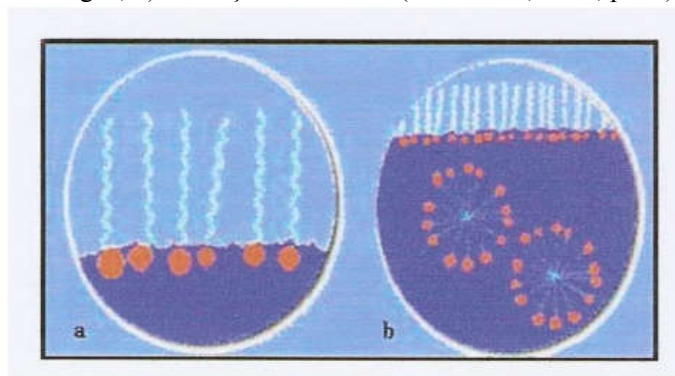


Os biossurfactantes são metabólitos microbianos que apresentam propriedades surfactantes, ou seja, diminuem a tensão superficial e apresentam alta capacidade emulsificante (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009; NITSCHKE; PASTORE, 2002). São obtidos principalmente por bactérias isoladas do solo, da água do mar, de areias contaminadas por óleos e de sedimentos marinhos. Embora sejam produzidos principalmente por bactérias,

fungos e leveduras também os produzem (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009; GOUVEA et al., 2003).

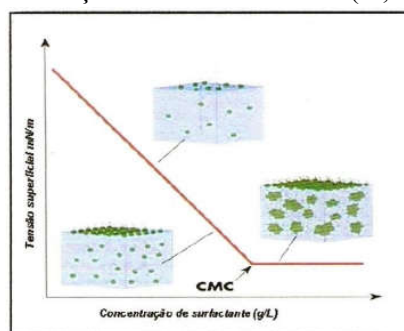
A medida que a concentração do biossurfactante aumenta no meio aquoso, a tensão superficial diminui, ocorrendo a formação de micelas (Figura 2) (SANTOS, 2012).

Figura 2: Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida: a) moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas (In: SILVA, 2008, p. 16)



Segundo Silva (2008, p. 16), “a concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica”. A concentração micelar crítica (CMC) determina a concentração mínima de biossurfactante necessário para formação de micelas. Várias micelas são formadas quando a CMC é atingida (Figura 3) (SILVA, 2008; SILVA, LIMA, 2007; PIRÔLLO, 2006; BARROS et al., 2007; GOLVEIA et al., 2003).

Figura 3: Formação de micelas na CMC (In; SILVA, 2008, p. 17)



A concentração micelar crítica (CMC) é utilizada periodicamente para verificar a eficiência e as características básicas de um bom biossurfactante que pode variar de 1 a 2000mg/L (SILVA, 2008; LIMA, 2007; PIRÔLLO, 2006; BARROS et al., 2007; GOLVEIA et al., 2003).

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).

A limitação da produção industrial e a comercialização em grande escala dos biossurfactantes é devido aos elevados custo dos substratos utilizados para produção. 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 biossurfactantes (ROVINA, EHRHARDT e TAMBOURGI, 2018).

Segundo Gouvea et al. (2003), “os biossurfactantes são classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biossurfactantes poliméricos, fosfolipídeos e ácidos graxos”. Estes compostos microbianos podem substituir em um futuro próximo os surfactantes químicos, principalmente em indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticos, produtos químicos agroindustriais, produtos de limpeza industriais e em processos de bioremediação, por serem biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade e estabilidade em valores altos de pH, temperatura e salinidade (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009). Um dos setores industriais em que podem ser utilizados é na limpeza de tanques de reservatórios de óleos, onde os resíduos e frações de óleos que sedimentam no fundo dos tanques são altamente viscosos. A ação detergente do biossurfactante diminui a viscosidade e há formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento e tornando o descarte desses resíduos menos problemático (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

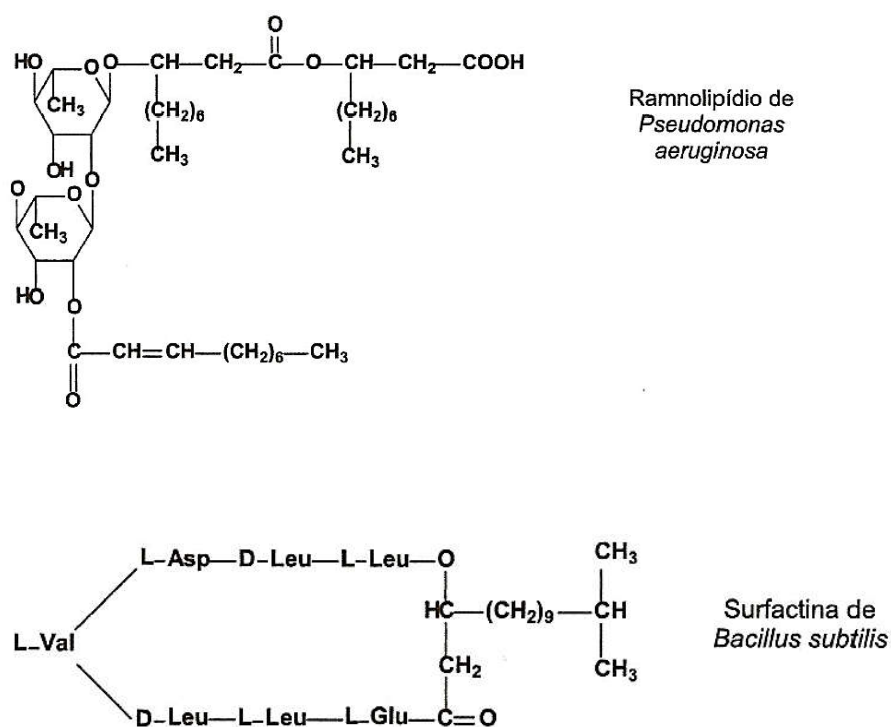
Os biossurfactantes podem ser classificados de duas formas mais gerais, primeira geração e de segunda geração. Os classificados como primeira geração, também chamados de “surfactantes verdes”, são entendidos como compostos produzidos por meio de sínteses químicas a partir de recursos renováveis ou extraídos 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

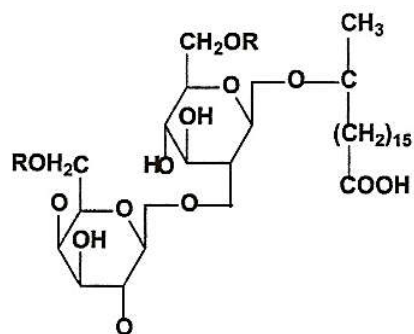
inteiramente a partir de reaproveitamento por um processo biológico, como biocatálise ou fermentação (ALBANO, 2014; SOETAERT, 2014).

Os biossurfactantes também podem ser obtidos por meio de procedimentos relativamente simples, dispensando investimentos altos para sua produção, já que podem ser utilizados resíduos agroindustriais como substrato, o que viabiliza o processo, visto que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009; BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010).

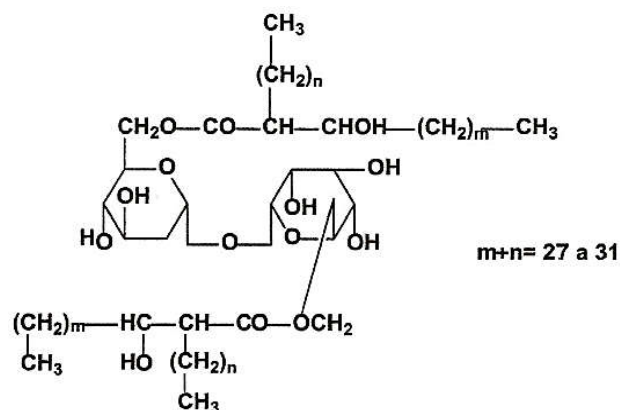
Os biossurfactantes apresentam estrutura semelhante, sendo constituído por uma parte lipofílica usualmente composta por uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato ou carboidrato. A grande parte dos biossurfactantes são neutros, ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até enormes cadeias poliméricas (PASTORE, 2002; SILVA LIMA, 2003; LIMA, 2007; SILVA, 2008; PIRÔLLO, 2006). Na Figura 4 pode-se verificar algumas estruturas de biossurfactantes.

Figura 4: Estruturas químicas de alguns biossurfactantes (In: SILVA LIMA, 2003, p.6)

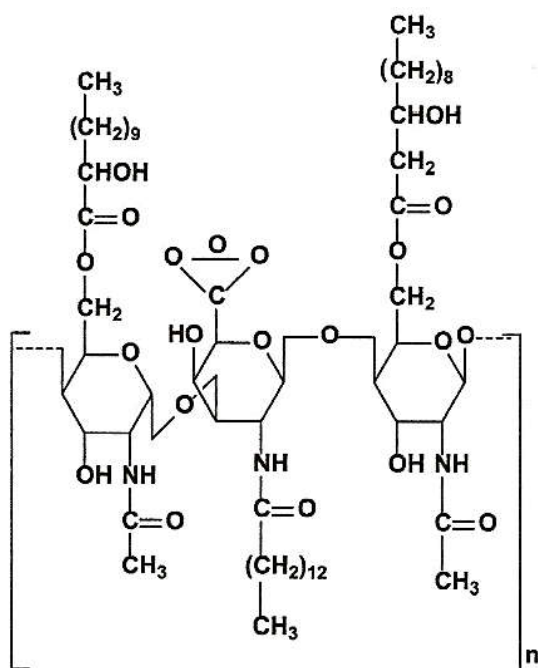




Sforolipídio de
Torulopsis magnoliae



Trealolipídio de
Rhodococcus erythropolis



Surfactante Polimérico
(Emulsan) de *Acinetobacter calcoaceticus*

Fonte: (In: SILVA LIMA, 2003, p.7)

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

originários da petroquímica. Dessa forma, os biossurfactantes passaram a ter cada vez mais espaço para estudos e aplicações 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). Os biossurfactantes apresentam propriedades de interesse e vantagens sobre os surfactantes sintéticos, na Tabela 1 pode ser verificadas algumas vantagens relativas aos tipos de compostos.

Tabela 1: Propriedades e vantagens dos biossurfactantes

CARACTERÍSTICAS	VANTAGENS
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
olerância a temperatura, pH, força iônica extremas	Permitem uma aplicação mais abrangente já que pode ser utilizado em condições drásticas de temperatura, pH e força iônica
Apresentam CMC baixas e alta atividade emulsificante	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 água/óleo 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, antimicrobianas 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

Na Tabela 2 estão descritos algumas funções e aplicações industriais dos biossurfactantes. (ZANINI, 2021)

Tabela2: Aplicações e funções industriais dos biossurfactantes

FUNÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	APLICAÇÕES INDUSTRIAIS
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
Estabilizantes	Têxtil
Agentes dispersantes	Papel e petrolífera
Sequestrantes de metal	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 Farmacêuticos

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

Atualmente, nos países industrializados existe uma grande tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos surfactantes de origem biológica, pois aliado ao fato de serem naturalmente biodegradáveis e causarem menos impacto ambiental apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis. Além disso, a grande diversidade química que apresentam, possibilita uma diversidade de aplicações (NITSCHKE; PASTORE, 2002; GOUVEA et al., 2003). Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção de biossurfactante a partir de um substrato indutor

acessível na região Nordeste e com possibilidades de barateamento em seu processo de sintetização.

3.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES E SUAS CARACTERÍSTICAS

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química e sua origem microbiana e constituem uma das principais classes de surfactantes naturais. De acordo com esta classificação as principais classes incluem: glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. Na tabela 1 estão apresentados os biossurfactantes de acordo com esta classificação (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SILVA LIMA, 2003; LIMA, 2007; SILVA, 2008; PIRÔLLO, 2006).

Tabela 3: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICRORGANISMO
Glicolipídeos	
-ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-soforolipídeos	<i>Torulopsisbombicola, T. apicola</i>
-treololipídeos	<i>Rhodococcuserythropilis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos E Lipoproteínas	
-Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus lichemiformis</i>
-Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-Serrawetina	<i>Serratiamarcescens</i>
-Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
-Gramicidina	<i>Bacillisbrevis</i>
-Polimixina	<i>Bacillispolymyxa</i>
Ácidos Graxos, Lipídeos Neutros E Fosfolipídeos	
-Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
-Lipídeos neutros	<i>Nocardiaerythropilis</i>
-Fosfolipídeos	<i>Thiobacillusthiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos	
-emulsan	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>
-biodispersan	<i>Acinetobactercalcoaceticus</i>
-liposan	<i>Cândida lipolytica</i>
-carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
-manana-lipídeo-proteína	<i>Cândida tropicalis</i>
Surfactantes Particulados	

-vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
-células	<i>Varias bactérias</i>

Fonte: (In: NITSCHKE; PASTORE, 2002, p. 773)

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, consequentemente, com diferentes propriedades surfactantes como pôde ser observado na Tabela 3 (PARVEEN et al., 2014). 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 bactérias do gênero *Bacillus* são grandes produtoras de lipopetídeos, que caracterizam biosurfactantes de grande eficiência.

Os glicolipídios podem ser classificados em mono, di, tri e tetrassacárideos 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 biosurfactantes, 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 biosurfactantes 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-alcanos (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).

Segundo Gouveia et al., 2003, a classe dos glicolipídeos compreende um grupo dos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos. Nesta classe destacam-se os ramonolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos. (L. A., Santos, 2012)

3.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *B. PUMILLUS*

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).

3.4. MELANCIA

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 biotensioativos 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).

Diante disso, optou-se em realizar o cultivo com a melancia (*Citrullus lanatus*), que é um fruto típico de clima tropical ou temperado, ela pertence à família das cucurbitáceas e apresenta alto índice frutífero. A melancia utilizada na presente pesquisa foi identificada

como da espécie Melancia Híbrida Combat(175), com polpa de coloração vermelho intenso e casca característica verde e predominância de verde claro (Figura 5).

Figura 5: A melancia em uma balança antes de ser cortada e separada suas partes



A melancia, originária das regiões secas da África tropical, é a Cucurbitácea mais produzida no mundo (MASSA, 2014). No Brasil, as regiões mais indicadas para o plantio da melancia situam-se no Semiárido Nordeste, nas quais podem ser plantadas em qualquer época do ano (CARVALHO, 1999). A fruta representa expressiva importância no agronegócio brasileiro, ocupando o quarto lugar dentre as olerícolas, com produção de 2.052.928 de toneladas no ano de 2010 (IBGE, 2010).

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção do extrato aquoso de melancia

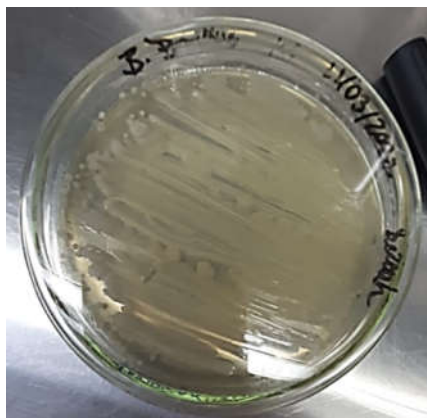
Para a composição dos meios de cultivo foi utilizado o suco de melancia, a fim de testa-lo quanto a eficiência na produção de biossurfactantes. A melancia foi adquirida no comércio local de João Pessoa. Foi lavada com água e sabão e seca com papel toalha. Em seguida, foi pesada e extraídos dela a polpa, a casca e a entre casca para avaliação do rendimento do fruto. Após a separação das sementes contido na polpa do fruto, a polpa foi processada com o uso de um mixer simples e assim obtido o suco concentrado de melancia, e em seguida o suco concentrado foi peneirado.

Posteriormente foram realizados os procedimentos de caracterização para medição de pH, sólidos solúveis (°Brix) e açúcares redutores (AR). 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).

4.1. 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 Agar Nutriente. Os microrganismos foram repicados periodicamente para manter a viabilidade celular, incubados a temperatura ambiente, aproximadamente 28°C por 24h e posteriormente mantidos sob refrigeração a 4°C. (Figura 6)

Figura 6: O microrganismo *B. pumilus* utilizado para o repique



4.2. PREPARAÇÃO DE 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 suco de melância (diluído até concentração de açúcares redutores totais 20 g.L^{-1}), extrato de levedura (1 g.L^{-1}), previamente esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm (Figura 4.2). O inóculo foi utilizado ao atingir absorvância desejada entre 0,6 e 0,8.

Figura 7: Inóculo do *B. pumilus* no substrato indutor contendo suco de melancia



4.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

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. Em triplicada, transferiu-se 25mL do inóculo nos meios estéril e a cada 24 h foi retirada 15mL de meio fermentado para realização das análises e obtenção dos resultados, os experimentos foram realizados por 72h (Figura 4.4).

4.4. ANÁLISES

4.4.1. Análise de 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 2 4h. 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 emultiplicado por 100 de acordo com a Equação 1 proposta por Wei et al., (2005).

$$IE = \frac{H_e}{H_t} \times 100$$

Onde:

IE= Índice de emulsificação após 24 h

HE = Altura emulsificada

HT = Altura total

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Rendimento do suco de melancia

A melancia utilizada no estudo, com peso total de 5,3 Kg, apresentou rendimento em casca, semente e polpa de, respectivamente, 31,11%, 0,85% e 66%. Aproximadamente 2% de sua massa total foi considerada como perda durante os processos de corte e separação da melancia. Na figura 6 é apresentado a melancia.

Tabela 4: Rendimento da melancia

PARTES	RENDIMENTO (%)
POLPA	66,0
CASCA	4,80
ENTRECASCA	26,31
SEMENTE	0,85
PERDAS	2,04

5.2. Caracterização do suco de melancia

A caracterização foi realizada com o objetivo de adequar o suco de melancia para o processo fermentativo. A tabela 5 apresenta os resultados da caracterização do suco de melancia.

Tabela 5: Características físico-químicas do suco de melancia

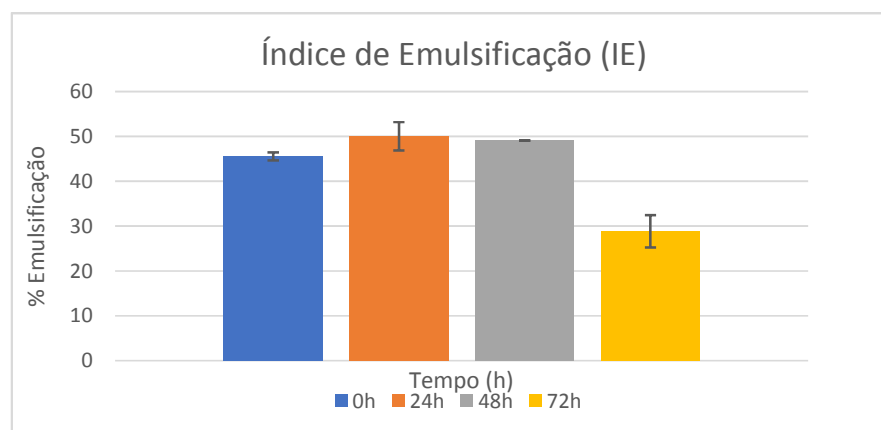
PARÂMETRO	VALOR
pH	5,15
°Brix	7,97
AR (g.L⁻¹)	8,17

O pH obtido foi 5,15 considerado ácido, o que não é propício para o crescimento de bactérias já que elas se desenvolvem melhor em pH próximo a neutralidade. Quanto a concentração de AR como é bastante elevada foi feita, posteriormente, diluição para obter a concentração de 20g.L⁻¹. A diluição contribui para reduzir a concentração de AR e 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.

5.3. Produção de bioemulsificantes e consumo de substrato

O suco de melancia foi avaliado como o substrato indutor do meio de cultivo para a cepa do microrganismo *Bacillus Pumilus*. O parâmetro avaliado para identificar a produção de biossurfactante foi o índice de emulsificação (Figura 8), os parâmetros foram avaliados a cada 24h de cultivo.

Figura 8: Índice de Emulsificação ao longo do cultivo de 72h totais



Na figura 8 estão dispostos os percentuais de emulsificação durante o tempo total de cultivo de 72h, com avaliação dos pontos a cada 24h. Pode-se observar um resultado mediano nas primeiras 24h de cultivo. O I.E começou no valor de $45,61 \pm 0,88\%$ e nas primeiras 24h obteve o percentual de $50,06 \pm 3,17\%$. Em seguida, no tempo de 48h o I.E foi de $49,13 \pm 0,027\%$ e posteriormente no tempo de 72h o valor foi de $28,88 \pm 3,60\%$. Tais valores evidenciam um melhor resultado de I.E nas primeiras 24h de cultivo.

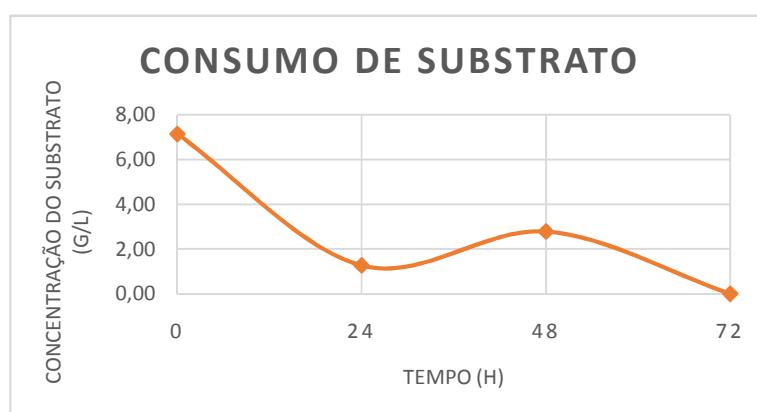
Os resultados demonstram que o substrato indutor ofereceu ótimas condições em até 48h de cultivo da *B. Pumilus* para produção de biossurfactantes com boa capacidade quanto a produção de emulsificantes. Tal conclusão se baseia nos estudos realizados por Youself (2004) que para uma emulsificação eficaz, o índice de emulsificação deve ser superior a 40%.

A caracterização dos cultivos foi realizada a cada 24h até completar 72h de cultivo. Pode-se observar um decréscimo no °Brix e no AR, evidenciando o consumo de glicose e açúcares redutores contidos no substrato. O pH se torna mais neutro isso devido ao crescimento bacteriano através da fermentação.

Tabela 6: Valores de caracterização do cultivo a cada 24h, ao longo de 72h

CARACTERIZAÇÃO			
TEMPO (H)	AR (g/L)	°Brix	pH
0	7,14	2,27	5,60
24	1,27	1,57	6,14
48	2,78	1,33	6,91
72	0,00	1,17	6,97

O consumo do substrato ao longo do cultivo teve um expressivo resultado nas primeiras 24h, demonstrando um consumo de 82,20%. Porém nas análises de 48h obteve-se valores mais altos do consumo de substrato, já nas análises de 72h o consumo de substrato demonstrou valores menores que os de 48h. Levando em consideração possíveis erros de medição nas análises de 48h, as análises de 72h demonstram que o substrato esteve em decréscimo, ou seja, sendo consumido concomitante ao desenvolvimento bacteriano.

Figura 9: Consumo de substrato ao longo do cultivo de 72h totais

6. CONCLUSÃO

O substrato indutor proposto no presente trabalho demonstrou favorecer a produção de bioemulsificantes nos estudos utilizando *B. Pumilus*. O maior percentual de emulsificação foi obtido no tempo de 24h de cultivo e ao ultrapassar o tempo total de 48h a emulsificação ótima já não é evidenciada. Os resultados indicam que o substrato utilizado juntamente com o microrganismo estudado indica ser promissor na produção de bioemulsificantes, mas ainda necessitam de estudos mais aprofundados de seu cultivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OLIVEIRA, C. Z. **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *Bacillus* EM MEIO COMCALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR**. Universidade Federal da Paraíba – UFPB. João Pessoa, Paraíba, 2021;

SANTOS, L., A. **PROPRIEDADES E APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES**. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA. Assis, 2012;

MASSA, N., M., L. **CONCENTRADO DE MELANCIA (*Citrullus vulgaris* SCHRAD): ACEITAÇÃO SENSORIAL, PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS, FÍSICO-QUÍMICOS E DETERMINAÇÃO DE FITONUTRIENTES**. B.CEPPA, Curitiba, v. 32, n. 1, p. 113-124, jan./jun. 2014. UFPB, 2014;

M. O. PARAENSE, P. E. AULER, K. C. S. FIGUEIREDO. **CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE MELANCIA ATRAVÉS DE MICROFILTRAÇÃO COM MEMBRANA DE ACETATO DE CELULOSE**. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Departamento de Engenharia Química, 2017.

Nisha S. Nayak, Shital C. Thacker, Vaishnavi C. Goswami, Krushali S. Jain, Devayani R. Tipre and Shailesh R. Dave. **BACILLUS PUMILUS -A MARINE BACTERIA: UNEXPLORED SOURCE FOR POTENTIAL BIOSURFACTANT PRODUCTION** ARTICLE INFORMATION, *NAAS Journal Score 2020 (4.31) SJIF: 2019 (4.196)* A Society of Science and Nature Publication. Bhopal India 2020.

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.

SILVA, R. K. P. **SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PARA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**. 2016.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. **BIOSSURFACTANTES: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES**. *Quim. Nova*, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

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 AGENTS FROM TWO *BACILLUS* SPECIES**. *Applied And Environmental Microbiology*, v.53, p.224-229, 1987.