

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

MATEUS BEZERRA CANDIDO

PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES OBTIDOS POR LINHAGENS DE *Bacillus subtilis*
UFPEDA 16 E *Bacillus safensis* 28

JOÃO PESSOA - PB

2023

MATEUS BEZERRA CANDIDO

**PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES
OBTIDOS POR LINHAGENS DE *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 E *Bacillus safensis* 28**

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. Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA, PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C217p Candido, Mateus Bezerra.

Produção, recuperação e caracterização de
biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus*
subtilis UFPEDA 16 e *Bacillus safensis* 28 / Mateus
Bezerra Candido. - João Pessoa, 2023.
82 f. : il.

Orientação: Andréa Farias de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Engenharia química. 2. Surfactina. 3. Algaroba -
Extrato Aquoso. 4. Parâmetros cinéticos. 5. Substratos
- Baixo Custo. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 66.0(043)

MATEUS BEZERRA CANDIDO

**PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES
OBTIDOS POR LINHAGENS DE *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 E *Bacillus safensis* 28**

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 29 de setembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ANDREA FARIAS DE ALMEIDA**
Data: 23/11/2023 11:10:14-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Profª. Drª. Andréa Farias de Almeida (PPGEQ/CT/UFPB)
(Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA**
Data: 23/11/2023 11:22:18-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Profª. Drª. Adna Cristina Barbosa de Sousa (DBCM/CBiotec/UFPB)
(Examinadora Interna à Instituição)

Documento assinado digitalmente
 **ANA KATERINE DE CARVALHO LIMA LOBATO**
Data: 23/11/2023 15:30:33-0300
Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Profª. Drª. Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato (Universidade Salvador)
(Examinadora Externa à Instituição)

A Deus,
a minha amada noiva,
Gabi,
aos meus pais,
Hermes e Mikaele,
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus sou eternamente grato, por me dar coragem, força e sabedoria para enfrentar todos os obstáculos encontrados e força de vontade para sempre alcançar meus objetivos.

A Gabi, minha noiva, por todo o amor e carinho, escutar-me por horas as ideias que tinha para a pesquisa, sempre estar ao meu lado nos momentos bons e em todos os momentos difíceis de incertezas e inseguranças, só tenho a agradecer por ser essa pessoa maravilhosa que desde o início sempre me incentiva a crescer buscando ser sempre uma pessoa melhor.

Aos meus pais Hermes e Mikaele, por sempre me doaram todo o apoio que preciso, nunca me deixando desistir dos meus sonhos e sempre me ensinando que com muita garra, persistência e trabalho os objetivos são alcançados. Sempre me ensinaram com suas atitudes a ser educado, honesto e perseverante.

A meus amados avós, Tereza, Socorro (*in memoriam*) e Vovô Chico!!! Por sempre me doaram todo amor e carinho e acreditarem em mim. Vocês possuem grande participação na pessoa que me tornei.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida, primeiramente por ter me aceito no grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da UFPB, também por todo o ensinamento a mim repassado ao longo de toda a jornada de desenvolvimento desse trabalho e toda orientação, confiança e dedicação. Também gostaria de agradecer por ser esse exemplo de profissional que pretendo seguir na minha carreira.

Aos colegas de laboratório Lucas, Daniel e Gabriel, meu reconhecimento pela colaboração, ajuda nos experimentos e momentos de descontração, foi um prazer trabalhar com vocês.

A Prof^a. Dr^a. Adna Cristina por disponibilizar o espaço no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal, para realização do cultivo dos microrganismos.

Ao técnico do Laboratório de Produtos Fermento e Destilados do departamento de Engenharia Química, por possibilitar análise de °Brix do substrato utilizado na pesquisa.

A equipe dos Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFRN por viabilizar a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A equipe do Laboratório BiotecFarm por disponibilizar o equipamento de FTIR, possibilitando a caracterização do bioproduto.

Aos membros da Banca: Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida, Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa, Prof^a. Dr^a. Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato, Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos, pela gentil colaboração na avaliação desse trabalho.

Aos funcionários da secretaria do PPGEQ, Fabricio e Nicholas, pela paciência e competência na solução dos problemas burocráticos.

A UFPB por conceder toda a estrutura e apoio necessário par a realização desse trabalho.

As agências de fomento CAPES e FAPESQ, por viabilizar a realização dessa pesquisa, através da concessão das bolsas de estudo.

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas anfifílicas com ampla capacidade de redução de tensão superficial e propriedades únicas, por serem sintetizados extracelularmente por microrganismos como *Bacillus subtilis* UFPEDA16 e *Bacillus safensis* 28, bactérias Gram-positivas e não tóxicas. O uso de substratos de baixo custo que possuem elevada concentração de açúcares pode reduzir os custos de produção de biossurfactantes. O presente estudo avaliou a capacidade de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e *Bacillus safensis* 28, utilizando como substrato o extrato aquoso da algaroba, e promoveu recuperação e caracterização do biossurfactante produzido. A produção de biossurfactante foi realizada em meio com 1% (v/v) de extrato aquoso da algaroba como substrato para *B. subtilis* UFPEDA 16, enquanto para *B. safensis* 28 foi analisado o meio contendo 1% (v/v) de extrato aquoso de algaroba sem e com suplementação de extrato de levedura a 1% (p/v), cultivados em frascos Erlenmeyers agitados em incubadora rotativa orbital a 200 rpm, 37°C e razão de aeração de 0,4. Amostras foram retiradas em tempos regulares para acompanhamento do crescimento microbiano, consumo de substrato e produção de biossurfactante por 120 h de cultivo. Posteriormente, foi realizado processo de recuperação do produto por precipitação ácida (HCl a 6N) e extração por solventes orgânicos (Diclorometano-Clorofórmio-Metanol). O biossurfactante recuperado foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) a fim de realizar sua caracterização. No cultivo utilizando a linhagem *B. subtilis* UFPEDA 16 obteve-se concentração celular na fase exponencial ($[X]$) de 2,91 g/L, produtividade em células (P_x) de 8,958 mg/L.h, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de 0,0107 h⁻¹, concentração de biossurfactante produzido 76,67 mg/L com uma capacidade de emulsificação de 80,65% em óleos de cadeia longa. Na produção *B. safensis* 28 obteve-se resultados mais favoráveis com o meio suplementado no qual a concentração celular máxima na fase exponencial ($X_{\text{máx.}}$) foi de 4,58 g/L, a produtividade em células (P_x) foi de 30,4 mg/L.h e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) é de 0,0469 h⁻¹. Em relação ao biossurfactante produzido obteve-se uma concentração de 130,03 mg/L com produtividade em produto (P_p) de 1,08 mg/L.h. Porém, o biossurfactante teve baixa capacidade de emulsificação 55%, já em relação a caracterização foi possível determinar que o biossurfactante produzido por *B. safensis* 28 em meio suplementado é de fato uma surfactina. Concluindo que as linhagens *B. subtilis* UFPEDA16 e *B. safensis* 28 foram capazes de produzir biossurfactante do tipo lipopeptídico a partir do extrato aquoso da algaroba, como substrato alternativo, nas condições propostas.

Palavras-Chave: Surfactina; Extrato Aquoso da Algaroba; Parâmetros Cinéticos; Substratos de Baixo Custo.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic molecules with an extensive capacity to reduce surface tension and unique properties, as they are synthesized extracellularly by microorganisms such as *Bacillus subtilis* UFPEDA16 and *Bacillus safensis* 28, Gram-positive and non-toxic bacteria. The use of low-cost substrates that have a high concentration of sugars can reduce biosurfactant production costs. The present study evaluated the production capacity of biosurfactants by *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 and *Bacillus safensis* 28, using the aqueous extract of mesquite as a substrate, and promoted recovery and characterization of the biosurfactant produced. Biosurfactant production was carried out in a medium with 1% (v/v) mesquite aqueous extract as a substrate for *B. subtilis* UFPEDA 16, while for *B. safensis* 28 the medium containing 1% (v/v) extract aqueous mesquite, without and with supplementation of 1% (w/v) yeast extract were analyzed, cultivated in Erlenmeyer flasks shaken in an orbital rotating incubator at 200 rpm, 37°C and aeration ratio of 0.4. Samples were taken at regular times to monitor microbial growth, substrate consumption and biosurfactant production for 120 h of process. Subsequently, a product recovery process was carried out by acid precipitation (HCl at 6N) and extraction by organic solvents (Dichloromethane-Chloroform-Methanol). The recovered biosurfactant was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) to characterize it. In cultivation using the *B. subtilis* UFPEDA 16 strain, a cell concentration in the exponential phase ($[X]$) of 2.91 g/L was obtained, cell productivity (P_x) of 8.958 mg/L.h, maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.0107 h⁻¹, biosurfactant concentration produced 76.67 mg/L with an emulsification capacity of 80.65% in long chain oils. In the production of *B. safensis* 28, more favorable results were obtained with the supplemented medium in which the maximum cell concentration in the exponential phase (X_{max}) was 4.58 g/L, the productivity in cells (P_x) was 30.4 mg/ L.h and maximum specific growth rate (μ_{max}) is 0.0469 h⁻¹. In relation to the biosurfactant produced, a concentration of 130.03 mg/L was obtained with a product productivity (P_p) of 1.08 mg/L.h. However, the biosurfactant had a low emulsification capacity of 55%. Regarding characterization, it was possible to determine that the biosurfactant produced by *B. safensis* 28 in supplemented medium is in fact a surfactin. Concluding that the strains *B. subtilis* UFPEDA16 and *B. safensis* 28 were capable of producing lipopeptide-type biosurfactant from the aqueous extract of mesquite, as an alternative substrate, under the proposed conditions.

Keywords: Surfactin; Aqueous Extract of Mesquite; Kinetics Parameters; Low-cost Substrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 -	Algarobeira (<i>Prosopis juliflora</i>)	19
Figura 3.2 -	Frutificação da <i>Prosopis juliflora</i>	20
Figura 3.3 -	Vagens da algaroba.....	20
Figura 3.4 -	Estrutura química de um monômero de surfactante	22
Figura 3.5 -	Organização molecular de surfactantes em uma micela direta (A) e em uma micela inversa (B).....	23
Figura 3.6 -	Estrutura química de alguns biossurfactantes.....	27
Figura 3.7 -	Estrutura da principal isoforma da surfactina.....	28
Figura 3.8 -	Surfactina na conformação Ala4 em forma de cela.....	29
Figura 3.9 -	Estrutura do principal homólogo da surfactina (iso-C ₁₅). Isoformas: A) Surfactina A, B) Surfactina B e C) Surfactina C	29
Figura 4.1 -	<i>Bacillus safensis</i> 28.....	46
Figura 4.2 -	<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16	46
Figura 4.3 -	Meio de cultivo autoclavado com presença de material particulado.....	48
Figura 4.4 -	Fluxograma padronização do inóculo.....	49
Figura 4.5 -	Fluxograma de produção dos biossurfactantes.....	51
Figura 4.6 -	Fluxograma das análises da produção.....	52
Figura 4.7 -	Fluxograma para recuperação do biossurfactante produzido.....	53
Figura 4.8 -	Fluxograma do processo de extração do biossurfactante produzido.....	54
Figura 5.1 -	Perfil da produção por <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16 relacionando produção de biomassa e consumo de substrato em relação ao tempo de produção.....	57
Figura 5.2 -	Índice de emulsificação (24h) com óleo lubrificante mineral e óleo vegetal para o biossurfactante obtido na produção por <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16.....	61
Figura 5.3 -	Perfil de eluição do padrão surfactina (Sigma-Aldrich)	63
Figura 5.4 -	Perfil de eluição do bioproduto obtido por <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16.....	63
Figura 5.5 -	Perfil de eluição padrão de lipopeptídeos. 5.5-1 padrão de Fengicina 5.5-2 mostra o padrão de iturina 5.5-3 mostra o padrão de surfactina.....	65
Figura 5.6 -	Cinética de produção por <i>Bacillus safensis</i> 28 em meio com extrato aquoso da algaroba (P1). Relacionando produção de biomassa e consumo de substrato em relação ao tempo de produção.....	66
Figura 5.7 -	Cinética de crescimento do <i>Bacillus safensis</i> 28 em meio com algaroba e extrato de levedura. Relacionando produção de biomassa e consumo de substrato em relação ao tempo de produção.....	67
Figura 5.8 -	Índice de emulsificação para o cultivo por <i>Bacillus safensis</i> 28 (P1)	71
Figura 5.9 -	Índice de emulsificação para o cultivo por <i>Bacillus safensis</i> 28 (P2)	72
Figura 5.10 -	Perfil de eluição do padrão surfactina (Sigma-Aldrich)	73
Figura 5.11 -	Perfil de eluição do bioproduto obtido por <i>Bacillus safensis</i> 28 (P1)	74
Figura 5.12 -	Perfil de eluição do bioproduto obtido por <i>Bacillus safensis</i> 28 (P2)	75
Figura 5.13 -	Espectro Infravermelho do biossurfactante produzido por <i>Bacillus safensis</i> 28.....	76
Figura 5.14 -	Espectro Infravermelho do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> #309 e surfactina padrão.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.....	25
Tabela 3.2 – Principais aplicações comerciais de biossurfactantes.....	33
Tabela 4.1 – Condições de cultivo com <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16 e <i>Bacillus safensis</i> 28	51
Tabela 5.1 – Características físico-químicas do extrato aquoso da algaroba.....	56
Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos de cultivo com <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16.....	58
Tabela 5.3 – Comparativo de resultados dos parâmetros cinéticos do presente estudo com a literatura	59
Tabela 5.4 – Comparativo de resultados de índice de emulsificação do presente estudo com a literatura.....	62
Tabela 5.5 – Resultados dos parâmetros cinéticos em relação ao crescimento celular.....	68
Tabela 5.6 – Comparativo de resultados cinéticos.....	69
Tabela 5.7 – Comparativo de resultados de emulsificação do presente estudo com a literatura.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ágar-LB	Ágar-Luria-Bertani
ART	Açúcares Redutores Totais
ATR	Refletância Total Atenuada
<i>B. pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>B. safensis</i>	<i>Bacillus safensis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CARG	<i>Compound Annual Growth Rate</i>
CBiotec	Centro de Biotecnologia
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
FAPESQ	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GRAS	<i>Generally Regarded as Safe</i>
HCl	Ácido Clorídrico
IE ₂₄	Índice de Emulsificação após 24 h
LEBp	Laboratório de Engenharia de Bioprocessos
MEOR	<i>Microbes for Enhance of Oil Recovery</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
P1	Produção 1 <i>B. safensis</i>
P2	Produção 2 <i>B. safensis</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
USD	<i>United States Dollar</i>
UV	Ultravioleta
X _{máx}	Concentração máxima de células
Y _{x/s}	Fator de conversão de substrato em células na fase exponencial
μ _{máx.}	Velocidade específica máxima de crescimento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 ALGARROBA.....	19
3.2 SURFACTANTES	21
3.3 BIOSSURFACTANTES	23
3.3.1 Classificação dos biossurfactantes	25
3.3.2 Surfactina	27
3.3.3 Propriedades dos biossurfactantes.....	31
3.3.4 Aplicações dos biossurfactantes.....	32
3.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES.....	34
3.4.1 Microrganismos produtores.....	34
3.4.2 <i>Bacillus subtilis</i>	34
3.4.3 <i>Bacillus safensis</i>	35
3.4.4 Fatores que influenciam na produção.....	36
3.4.5 Fontes nutritivas alternativas.....	36
3.4.6 Processos de produção	38
3.5 CONDIÇÕES OPERACIONAIS.....	39
3.6 CINÉTICA DE PRODUÇÃO.....	40
3.7 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES ..	42
3.7.1 Precipitação ácida.....	43
3.7.2 Extração por solvente	43
3.7.3 Cromatografia.....	44
3.8 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	45

3.8.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com refletância total atenuada (ATR).	45
4 METODOLOGIA	46
4.1 MICRORGANISMOS	46
4.2 SUBSTRATO	46
4.2.1 Caracterização físico-química do substrato	47
4.3 PREPARO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	48
4.4 PREPARO DO INÓCULO	49
4.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	50
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE	52
4.6.1 Índice de emulsificação	52
4.7 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	53
4.7.1 Precipitação ácida para recuperação do bioproduto	53
4.7.2 Extração líquido-líquido para recuperação do bioproduto	53
4.8 PURIFICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO	54
4.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	54
4.9 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	55
4.9.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com refletância total atenuada (ATR).	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO AQUOSO DE ALGARROBA	56
5.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16	56
5.2.1 Análise dos parâmetros cinéticos de produção	56
5.2.2 Análise da produção do biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16	60
5.2.3 Processos de purificação de biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16	62
5.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE <i>Bacillus safensis</i> 28	65
5.3.1 Análise da cinética de produção de biomassa e consumo de substrato	65
5.3.2 Análise da produção do biossurfactante por <i>Bacillus safensis</i> 28	70

5.3.3 Processos de purificação de biossurfactante por <i>Bacillus safensis</i> 28	73
5.3.4 Caracterização de biossurfactante por <i>Bacillus safensis</i> 28	76
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfifílicas (tensoativas), produzidos por microrganismos, sendo alternativa biodegradável aos surfactantes químicos. Esses bioprodutos possuem características em comum com os surfactantes químicos sendo elas: redução de viscosidade de líquidos, emulsificantes e desemulsificantes, redução da tensão superficial e solubilização de compostos insolúveis em água, atividade anticorrosiva e lubrificante e de umedecimento. Além dessas características como: baixa toxicidade, biodegradabilidade e atividade antibióticas permitem aplicações mais específicas (VARGAS et al., 2023).

As espécies do gênero *Bacillus* estão entre as mais relevantes para produção de biossurfactantes. *B. subtilis* é considerada GRAS (*Generally Regarded as Safe*), sendo não patogênicas e, em consequência, seus metabólitos também, possuem capacidade metabólica elevada e alta capacidade de produção de lipopeptídeos (MAIA NETO, 2021). Já o *B. safensis* possuem alta tolerância a concentrações de sal, metais pesados e radiações gama e ultravioleta, e sintetizam lipopeptídeos que podem ser aplicados em condições mais extremas. Vale salientar, que apesar dessas características, não há muitos relatos na literatura sobre a produção de biossurfactantes por *B. safensis*, faz-se necessário investigação dessa capacidade (DAS e KUMAR, 2019).

A eficiência da produção de biossurfactantes possui relação direta com os custos relativos ao processo (meio de cultivo, condições operacionais e etapas de purificação) e a capacidade de síntese pelo microrganismo utilizado. Tais custos são referentes à fonte nutritiva utilizada e aos processos de recuperação e purificação, que dificultam a ampliação de escala em nível industrial (ROVINA, EHRHARDT e TAMBOURGI, 2018). Uma possível estratégia para redução de custos operacionais é a utilização de matérias-primas de baixo custo e renováveis. Assim, pesquisas estão sendo desenvolvidas com a finalidade de estudar substratos alternativos que ainda apresentem em sua composição nutrientes favoráveis a replicação dos microrganismos produtores de biossurfactantes, porque quanto maior a taxa de replicação consequentemente maior a produção dos biossurfactantes.

A utilização do extrato aquoso da algaroba, rico em carboidratos, extraído de algarobeiras (*Prosopis juliflora* (SW) DC) presentes em abundância no Sertão do Nordeste pode ser uma alternativa a substratos tradicionais para produção de biossurfactantes. Atualmente, a algaroba tem aplicações em processos de produção de aguardente e de

bioetanol a partir das suas vagens, que possuem elevadas concentrações de açúcares tornando potencial substrato em processos biotecnológicos (ALVES, SANTOS e SILVA, 2022). Portanto, o caldo extraído das vagens de algaroba torna-se um meio nutritivo muito favorável à produção de biossurfactantes microbianos. O grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da UFPB vem estudando a utilização do extrato aquoso da algaroba em diferentes concentrações para produção de biossurfactantes e tem verificado seu potencial como substrato (DIAS et al., 2018; DIAS, 2019).

Devido a necessidade de buscar alternativas que viabilizem a produção de biossurfactantes em escala industrial, o presente estudo propõe avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes por *B. subtilis* UFPEDA 16 e *B. safensis* 28 utilizando como substrato o extrato aquoso da algaroba.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e *Bacillus safensis* 28 utilizando como substrato o extrato aquoso da algaroba, recuperar e caracterizar o biossurfactante produzido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a cinética de crescimento do *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e *Bacillus safensis* 28 em meio contendo extrato aquoso de algaroba;
- Produzir biossurfactantes a partir do extrato aquoso da algaroba;
- Determinar a capacidade de emulsificação do biossurfactante obtido;
- Promover a recuperação dos biossurfactantes produzidos no sistema;
- Identificar os biossurfactantes produzidos por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Verificar a estrutura do biossurfactante produzido por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ALGAROBA

A algarobeira (*Prosopis juliflora*), Figura 3.1, é uma espécie de xerófila, uma árvore da família das *Leguminosae* que pertence ao gênero *Prosopis*, nativa no deserto de Piúra no Peru, possuindo mais de 45 espécies conhecidas e difundidas espontaneamente em três continentes América, Ásia e África. As algarobeiras são plantas que possuem como principal característica se desenvolver bem em regiões com baixos índices pluviométricos anuais (DIAS, 2017).

Figura 3.1 – Algarobeira (*Prosopis juliflora*).



Fonte: RIBASKI et al., (2009).

Por se desenvolverem bem em clima adverso essas plantas foram introduzidas no Brasil em 1942 na cidade de Serra Talhada no interior do estado do Pernambuco. Utilizada como uma alternativa de nutrição para os animais da região em períodos de secas. Já que as vagens da algaroba quando maduras possuem elevado teor de sacarose e matéria seca de aproximadamente 84%. A algarobeira (*Prosopis juliflora*) é uma planta de fácil disseminação (Figura 3.2) por ter a capacidade de crescer em diferentes classes de solos como rochosos, arenosos, salinizados e solos aluviais que possui maior facilidade de se desenvolver. Outra característica é a necessidade de pouca água no seu desenvolvimento. Tornando possível

desenvolvimento de culturas dessa espécie para destinadas a suprir uma demanda de extrato aquosos oriundo das vagens (RIBASKI et al., 2009).

Figura 3.2 – Frutificação da *Prosopis juliflora*.



Fonte: RIBASKI et al., (2009).

De acordo com Silva et al. (2001), as vagens de algaroba, Figura 3.3, possuem grande potencial como aditivos em silos de capim, por possuírem teor de glicose em torno de 25 a 28%, proteínas de 11 a 17% e ácidos orgânicos de 14 a 20%, além de pectinas e outras substâncias que torna esse produto uma excelente fonte nutritiva (DIAS, 2017).

Figura 3.3 – Vagens da algaroba.



Fonte: RIBASKI et al., (2009).

A algarobeira tem alto potencial em reflorestamento devido a suas características de precocidade e resistência a seca. Como é uma cultura de rápida disseminação e baixo custo

operacional, torna-se uma boa alternativa para produção de substrato nutritivo em processo de produção de biossurfactantes. Através do desenvolvimento de um projeto de produção dessas árvores a fim de obter suprimento nutritivo (RIBASKI et al., 2009).

A maioria das aplicações da algaroba é artesanal, realizada na zona rural, sem uso de equipamentos sofisticados e processos sistematizados. As vagens são trituradas e utilizadas para a produção de farinha, a qual é utilizada para produção de pães, bolos e biscoitos. Há a possibilidade de serem quebradas em pedaços pequenos, torrados e posteriormente moídos e utilizados como substituto do café. Podem ser cozidas e usadas de forma semelhante ao feijão, entre outras aplicações como produção de bebidas, xaropes, geleias, gomas, entre outros (ALVES et al., 2022).

Sua aplicação patenteada é em processos de produção de aguardente bidestilada envelhecida em barris de carvalho a partir da vagem da algaroba e a produção de bioetanol também a partir da vagem. As vagens da algaroba possuem açúcares que as tornam muito propensas a fermentação (ALVES et al., 2022). Por essas características o extrato aquoso das vagens de algaroba é uma boa escolha para meio de cultivo para produção de biossurfactantes utilizando bactérias.

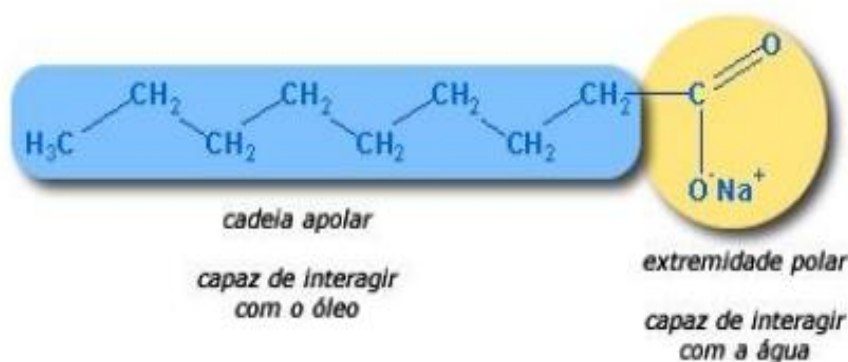
O uso do extrato aquoso de algaroba foi empregado em pesquisas anteriores do grupo de pesquisa. No qual Dias (2017) extraiu das vagens de algaroba o extrato aquoso e o utilizou para produção de biossurfactantes com *B. subtilis* UFPEDA 86, obtendo bom resultado na produção, posteriormente Dias (2019) utilizou o extrato aquoso produzido para avaliar a estabilidade emulsificante do biossurfactante produzido pela mesma linhagem de *B. subtilis*, determinando uma capacidade de emulsificação de 83 % para óleo mineral.

3.2 SURFACTANTES

O mercado de surfactantes está em crescente evolução, as movimentações de mercado foi de USD 43,5 bilhões em 2022 e a expectativa de crescimento é para USD 57,8 bilhões até 2028. Entre as principais razões para as perspectivas positivas está: a demanda crescente para indústrias de cuidados pessoais, indústrias de uso final como aplicações de limpeza, além da crescente demanda por surfactantes bioderivados e verdes (MARKETS, 2023). Tal demanda explica a expansão do mercado de biossurfactantes avaliado em US\$ 1,2 bilhão em 2022, crescendo a um CARG (*Compound Annual Growth Rate*) de 11,2% no período de 2022 a 2027 e perspectiva de atingir US\$ 1,9 bilhão em 2027 (MARKETS e MARKETS, 2022).

Os surfactantes são substâncias com capacidade de alterar as propriedades superficiais de um líquido e sua interface com demais fluidos (PAIVA, 2023). Esses compostos são formados por uma parte hidrofóbica (apolar), composta por uma cadeia alifática e uma parte hidrofílica (polar) (Figura 3.4), que pode ser constituída por algumas proteínas, aminoácidos e carboidratos. Essas características são importantes para determinar sua aplicação como emulsificante, reduzindo a tensão superficial, acrescentando aos líquidos imiscíveis maior biodisponibilidade, mobilidade e a degradação da parte insolúvel de compostos orgânicos (MAROLDI, 2018).

Figura 3.4 – Estrutura química de um monômero de surfactante.

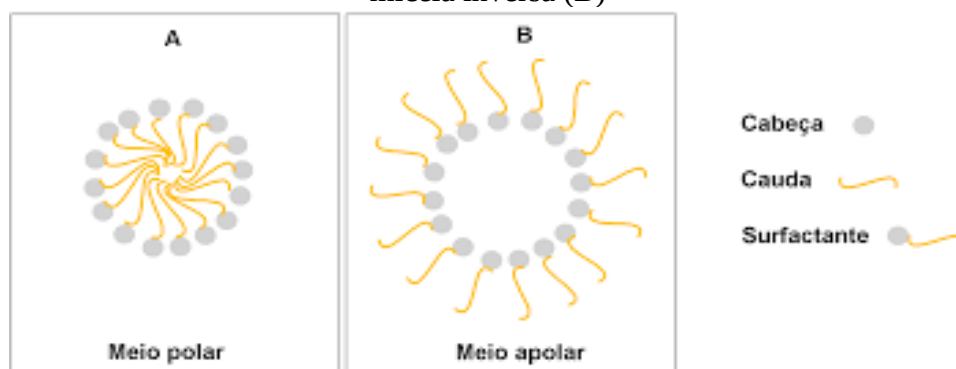


Fonte: Rocha (2017)

A estrutura de um monômero de surfactante é composta por uma cadeia carbônica que permite a interação com compostos apolares como óleo e compostos carbônicos, enquanto, a porção polar interage com a água e outros compostos polares promovendo a redução da tensão interfacial entre as fases aquosas e oleosas, proporcionando ao composto a característica básica de um biosurfactante (BEZERRA et al., 2019).

À medida que a concentração de surfactantes no meio aquoso aumenta ocorre diminuição da tensão superficial por meio da formação de micelas. Micelas são agregados de moléculas anfipáticas que podem se organizar para formar a micela direta quando a porção hidrofílica se encontra na parte externa em contato com o meio, e a porção hidrofóbica na parte interna (Figura 3.5 A). Já a micela inversa (Figura 3.5 B) é formada com a porção hidrofóbica posicionada para a parte externa em contato com o meio, enquanto a porção hidrofílica se posiciona na parte interna (ROCHA, 2017). As micelas são termodinamicamente estáveis no equilíbrio químico quando há surfactantes livres em solução.

Figura 3.5 – Organização molecular de surfactantes em uma micela direta (A) e em uma micela inversa (B)



Fonte: <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>

De acordo com Mulligan (2004), um bom surfactante tem a capacidade de redução da tensão superficial da água de 72 para 35mN/m e de reduzir a energia entre dois líquidos imiscíveis, chamada de tensão interfacial. Desse modo, a eficácia de um surfactante é avaliada em termos de sua capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais dos sistemas (ROCHA, 2017).

Os surfactantes são amplamente utilizados em indústrias de petróleo, cosméticos, detergentes, alimentos, têxteis, papel, e empregados em processos de biorremediação, recuperação de óleo e agentes antimicrobianos, na agricultura e tem aplicações em tratamento de eliminação de metais pesados em solos poluídos. A grande maioria dos surfactantes produzidos são derivados do petróleo, possuem baixa biodegradabilidade e alta toxicidade (SELVAM et al., 2020).

O alto caráter tóxico e a baixa biodegradabilidade dos surfactantes em conjunto com a preocupação em utilizar produtos com alto impacto ambiental torna importante o desenvolvimento de pesquisas, por compostos com características semelhantes aos surfactantes, porém biodegradáveis e atóxicos (SELVAM et al., 2020).

3.3 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes podem ser produzidos por microrganismos, em grande parte por bactérias, mas também por algumas espécies de fungos e leveduras (PAIVA, 2023). Além dos produzidos por microrganismos, compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, como plantas (saponinas) e o organismo humano (saís biliares), compostos considerados surfactantes naturais (ARAUJO, FREIRE e NITSCHKE, 2013)

Os biossurfactantes possuem propriedades similares aos surfactantes sintéticos, entre elas: redução de viscosidade de líquidos, emulsificantes e desemulsificantes, redução da tensão superficial e solubilização de compostos insolúveis em água, atividade anticorrosiva e lubrificante e de umedecimento. Dentre essas propriedades a de maior interesse da indústria é a de emulsificação, por ocasionar a dispersão coloidal de líquidos imiscíveis. Pode-se destacar as propriedades inerentes aos biossurfactantes apresentam uma maior eficiência na redução da tensão superficial, podem ter características adicionais como atividade antibiótica e a degradação de hidrocarbonetos (VARGAS et al., 2023).

As moléculas dos biossurfactantes possuem caráter anfifílico, de superfície ativa, com estrutura constituída por parte hidrofílica formada por um grupo iônico (catiônico ou aniônico), não iônico ou anfotérico, polar, e a parte hidrofóbica formada por um grupo apolar, incidindo em um hidrocarboneto (BEZERRA et al., 2012). A porção hidrofílica da molécula normalmente é constituída por mono, oligo ou polissacarídeos; proteínas ou peptídeos e a porção hidrofóbica composta por ácidos graxos saturados, insaturados e hidroxilados ou álcoois graxos (SECATO et al., 2016).

Os biossurfactantes são obtidos por processos *in vitro* simples, normalmente, por meio de microrganismos com habilidade de síntese utilizando substratos como carboidratos, óleos, compostos carbonados, e ainda substratos alternativos ricos em nutrientes para o desenvolvimento microbiano, como subprodutos da agroindústria e seus resíduos (ROCHA, 2017). Os biossurfactantes microbianos podem desempenhar funções como aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, promover a atividade antimicrobiana e complexar metais pesados reduzindo a toxicidade, biodegradabilidade (BEZERRA et al., 2012). Os microrganismos produtores desses bioprodutos utilizam os substratos hidrofílicos para a síntese da porção polar da molécula à medida que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a formação da cadeia hidrocarbônica (VARGAS et al., 2023).

Os biotensoativos em comparação aos surfactantes sintéticos demonstram desempenho superior e alta estabilidade em algumas situações extremas de pH, temperatura e alta concentração de sais, condições operacionais comuns a algumas aplicações nas quais esses bioprodutos são aplicados (BEZERRA et al., 2012). Outras características que os tornam bastante atrativos para diferentes áreas da indústria são: baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (BARCELOS et al., 2014); maior capacidade de formação de espuma (BARROS et al., 2007). Como possuem caráter anfifílico são capazes de reduzir a tensão superficial e a tensão interfacial, nas interfaces de dois líquidos ou líquido sólido tornado melhor a mistura de duas fases imiscíveis (AL-BAHRY et

al., 2013). Além de agir como detergentes, umectantes emulsificantes, espumantes e dispersantes (BARCELOS et al., 2014).

3.3.1 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados por sua composição química, influenciada pelo meio nutritivo, e origem microbiana. Cada microrganismo produtor é responsável por sintetizar um tipo de biossurfactante com características e propriedades únicas, tal fato proporciona a relação dos biossurfactante em classes distintas para cada tipo. As maiores classes de biossurfactantes são glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídios, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (BUGAY, 2008). As principais classes de biossurfactantes podem ser observadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos

Tipo de Surfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Totulopsis bombicola</i>
	<i>T. apícola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
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: (DESAI e BANAT, 1997)

Os glicolipídeos são biossurfactantes formados geralmente por carboidratos associados a uma cadeia longa de ácidos alifáticos ou hidroxialifáticos. Tais carboidratos podem ser manose, glicose, ramnose, ácido galacturônico ou galactose. Dentre os glicolipídeos mais importantes tem-se os trealolipídeos, soforolipídeos e ramnolipídeos (ROCHA, 2017).

Os lipopeptídeos e lipoproteínas são os biossurfactantes mais interessantes devido às suas características como alta atividade superficial apresentando eficiência como tensoativo além do potencial como antibiótico. Esses compostos são cíclicos formados por uma condensação de um ácido graxo e um oligopeptídeo (ROCHA, 2017). Nessa classe de compostos encontra-se o biossurfactante produzido por bactérias do gênero *Bacillus* a surfactina que se destaca entre os biossurfactantes já documentados por suas propriedades.

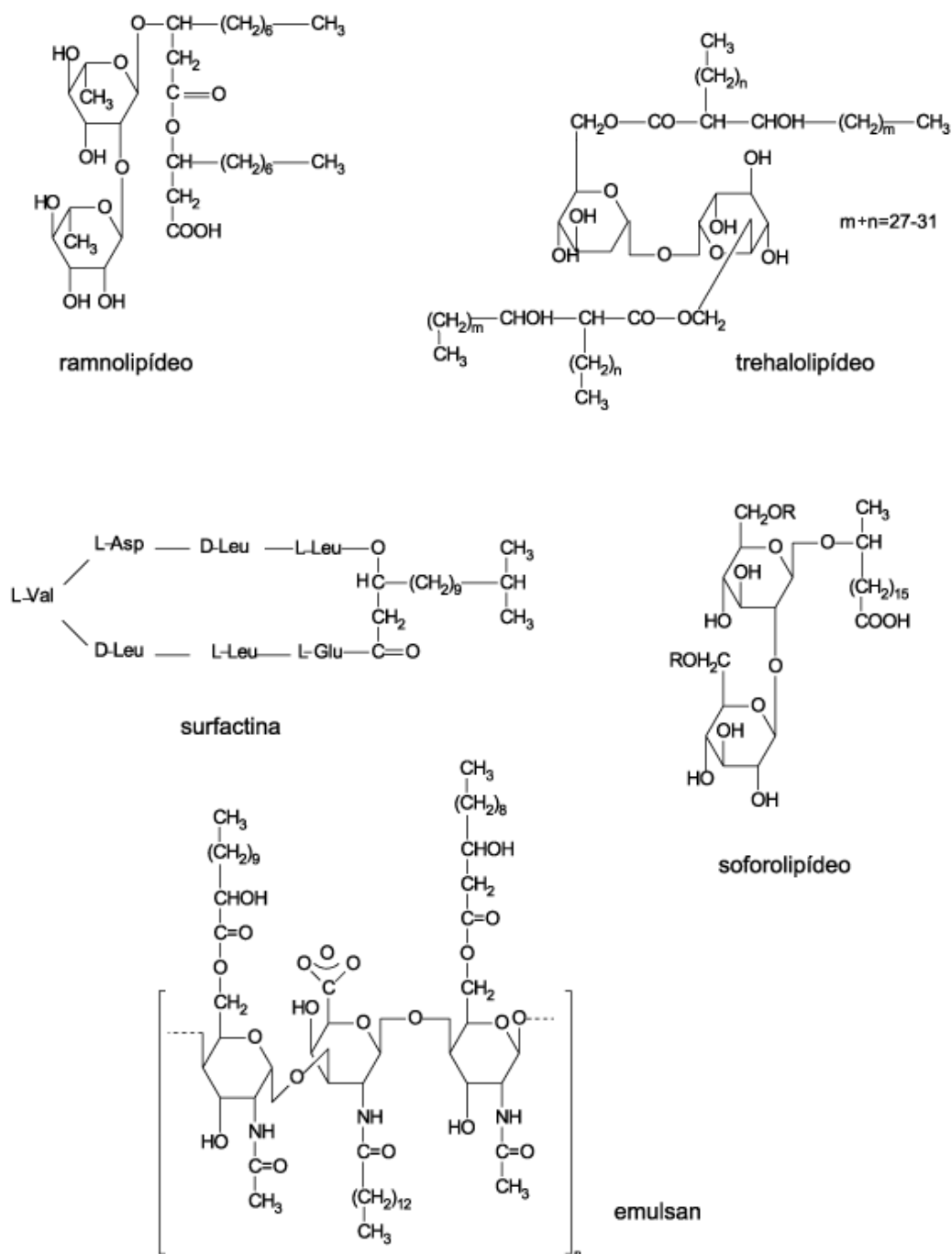
A surfactina é considerada um dos melhores biossurfactantes produzidos e mais eficazes por possuir uma capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 N/m, além de outras propriedades como atividade antiviral, antitumoral, antimicrobiana e são não patogênicos (FELIX et al., 2019).

A classe dos ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídios são surfactantes que apresentam em sua estrutura ácidos graxos e fosfolipídios, são normalmente sintetizados por bactérias e leveduras que utilizam como fonte de carbono n-alcenos. Esses compostos são formados por uma molécula de glicerol unida através de ligações éster a dois ácidos graxos e a um grupamento fosfato (ROCHA, 2017).

Os surfactantes poliméricos é uma classe de biossurfactantes que apresentam alta afinidade pela interface óleo/água formando emulsões estáveis, que mesmo em baixas concentrações possuem elevados índices de emulsificação (BORGES, 2011). Entre os surfactantes poliméricos os mais estudados são emulsan, liposan, alasan e lipomanan (ROCHA, 2017).

A classe dos surfactantes particulados é composta em sua maioria por vesículas extracelulares que apresentam hidrofobicidade e estão envolvidos na captação de alcanos para as células microbianas (GAUTAM e TAYAGI, 2005). A estrutura química de alguns biossurfactantes pode ser observada na Figura 3.6.

Figura 3.6 – Estrutura química de alguns biossurfactantes.



Fonte: (NITSCHK e PASTORE, 2002).

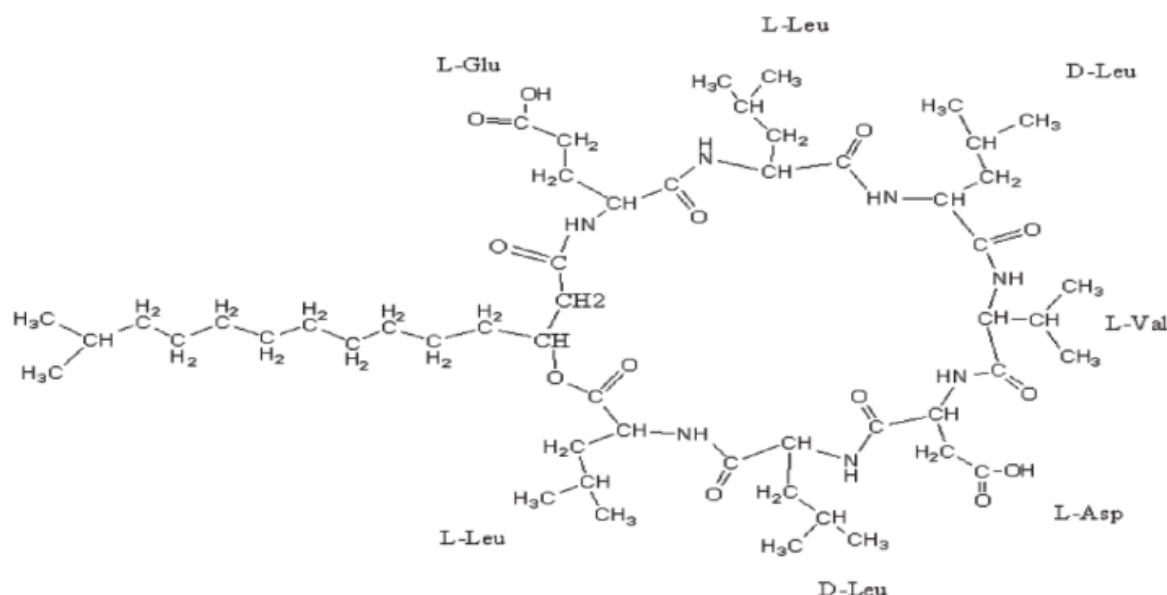
3.3.2 Surfactina

Os principais biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* podem ser classificados em três famílias compostas por peptídeos cíclicos: as iturinas, as fengicinas e as surfactinas. Todos a base de lipopeptídeos possuem em sua composição peptídeos hidrofílicos de sete a dez aminoácidos, podendo diferir na sequência desses aminoácidos ligados a um ácido graxo

hidrofóbico com comprimento de cadeia carbônica variado (LARINI et al., 2017). As famílias se subdividem em isoformas diferem entre si na composição e na sequência dos aminoácidos. As isoformas podem ainda se dividir em séries homólogas variando no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica (BUGAY, 2008).

A surfactina é um biossurfactante isolado a partir de processos utilizando cepas de *B. subtilis* para sua obtenção, e possui atividade emulsificante maior que o surfactante sintético lauril sulfato de sódio (PAIVA, 2023). Sendo considerado o biossurfactante mais potente já documentado, é um lipopeptídeo produzido em sua maioria por bactérias gram-positivas, *B. subtilis*. A determinação da estrutura primária da surfactina (Figura 3.7) foi realizada por Kakinuma et al. (1969) e foi obtida por meio do sobrenadante da cultura de *B. subtilis* (LARINI et al., 2017).

Figura 3.7 – Estrutura da principal isoforma da surfactina.

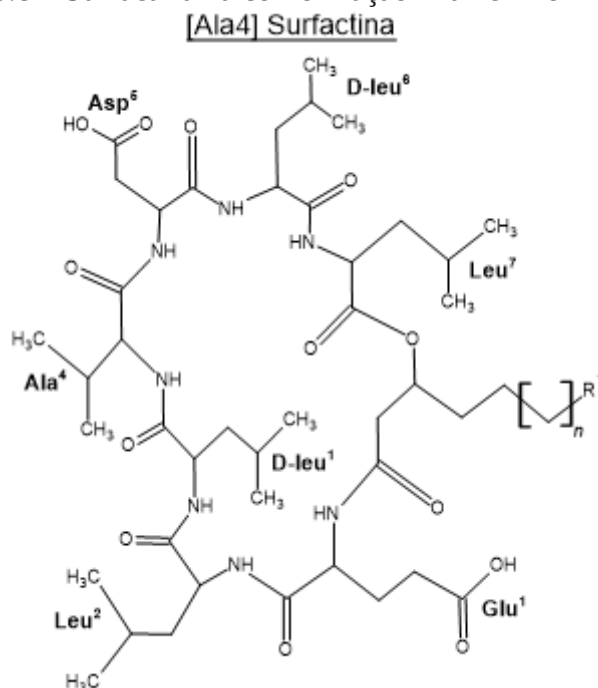


Legenda: surfactina da figura é composta em parte por uma porção peptídica de sete aminoácidos dispostos em sequência quiral LLDLLDL (L-ácido glutâmico, L-leucina, D-leucina, L-valina, L-ácido aspártico, D-leucina e L-leucina).

Fonte: Barros et al. (2007).

A surfactina em sua estrutura é um heptapeptídeo macrocíclico acilado por um beta-hidroxiácido de cadeia longa em que o grupo hidroxila encontra-se ligado a uma carbonila terminal formando um anel de lactona. A conformação da molécula é apresentada em forma de cela, na qual os polos hidrofílicos e hidrofóbicos forma um tipo de garra, a Figura 3.8 mostra conformação de uma isoforma da surfactina (PAIVA, 2023).

Figura 3.8 – Surfactina na conformação Ala4 em forma de cela.



Fonte: Adaptado de Paiva (2023).

A surfactina natural é uma mistura de isoformas que diferem ligeiramente em suas propriedades físico-químicas, por variações de composição como diferenças na sequência de aminoácidos componentes do anel, ligação do componente hidróxido graxo e variações do tamanho da cadeia carbônica. Essas alterações são causadas por condições do seu processo produtivo como linhagem de microrganismos, composição do meio de cultivo e processo produtivo do biossurfactante, sendo mais determinante que a interferência genética nessas alterações (ROCHA, 2017).

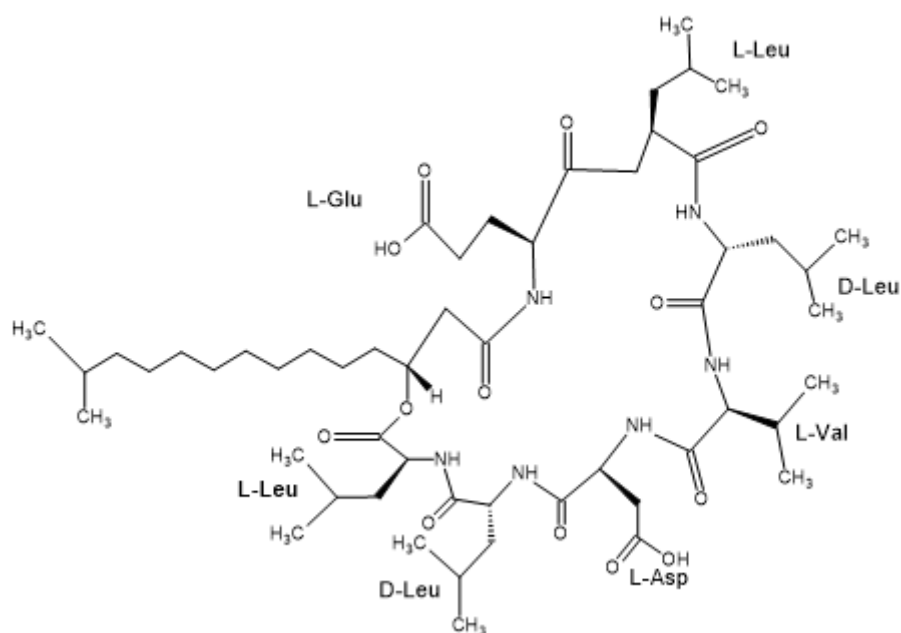
A aplicabilidade das surfactinas em áreas como biotecnologia, medicina e alimentícia causou um grande interesse em buscar formas de sintetizar esses compostos em larga escala com custos baixos. O desenvolvimento de pesquisas, proporcionou a descoberta de novas isoformas da surfactina, segundo Bonmartin et al. (2003) estima-se que mais de 20 lipopeptídeos da família das surfactinas já foram relatados na literatura. Apesar de existirem diversos lipopeptídeos já identificados a surfactina continua a ser o mais conhecido dentre os lipopeptídeos redutores de tensão superficial, devido a suas propriedades únicas.

As surfactinas possuem isoformas A, B e C (Figura 3.9) diferindo na sequência de aminoácidos e no número de átomos de carbono do ácido graxo. Dentre as isoformas a surfactina A (Figura 3.4) é a principal delas possuindo em sua parte peptídica sete aminoácidos dispostos em sequência quiral LLDLLDL (L-ácido glutâmico, L-leucina, D-leucina, L-valina, L-ácido aspártico, D-leucina e L-leucina), diferindo das isoformas B e C o

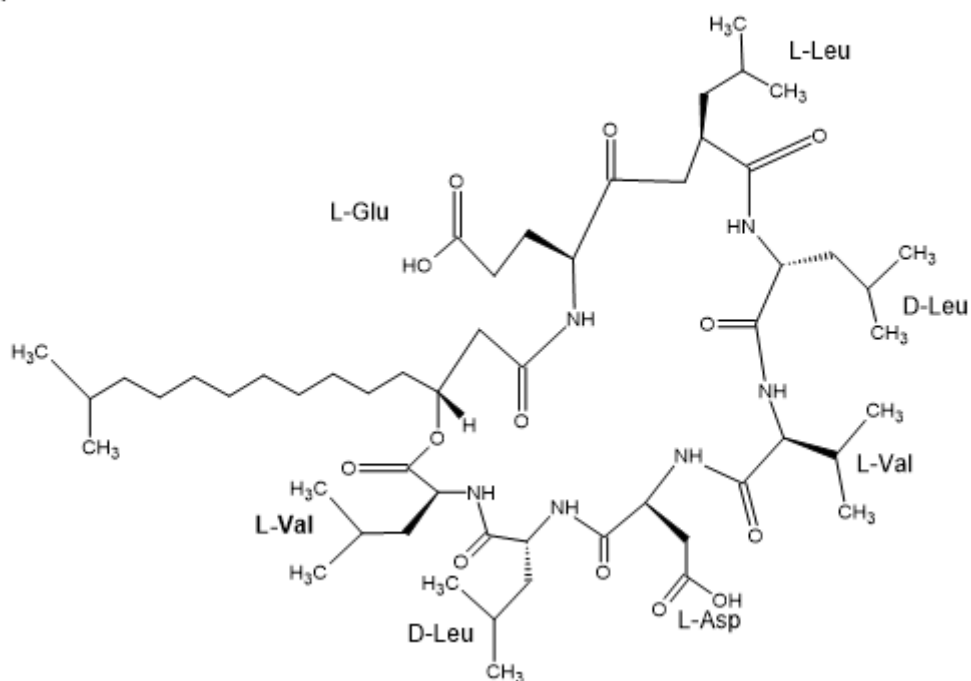
sétimo aminoácido sendo respectivamente L-valina e L-isoleucina. Já as condições de cultivo e as linhagens de bactérias produtoras são responsáveis pela composição da porção peptídica e dos ácidos graxos β -hidroxi (LARINI et al., 2017).

Figura 3.9 – Estrutura do principal homólogo da surfactina (iso-C₁₅). Isoformas: A) Surfactina A, B) Surfactina B e C) Surfactina C.

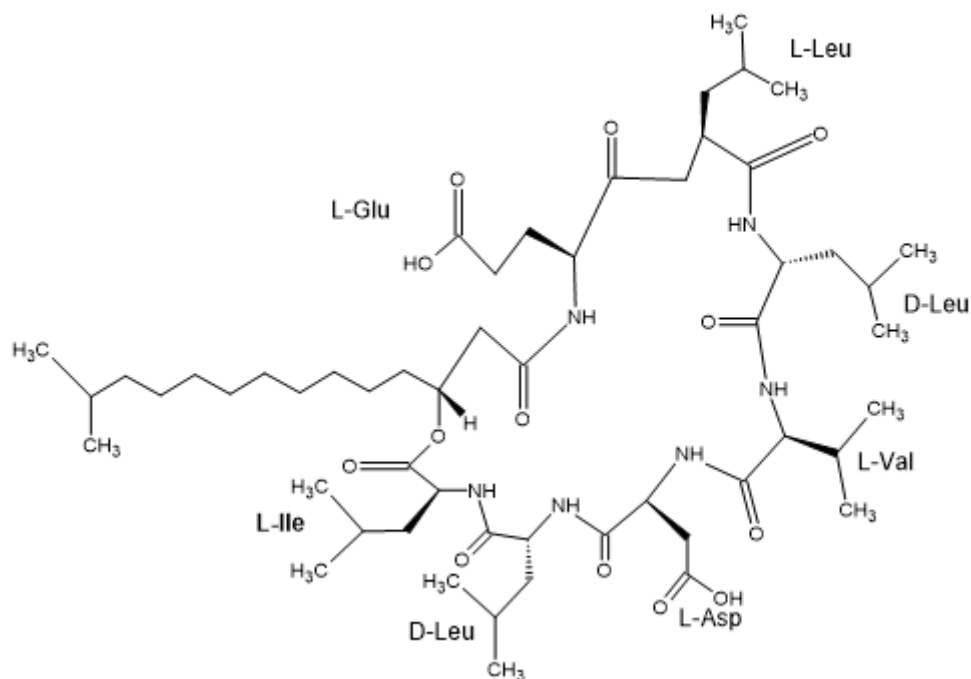
A)



B)



c)



Fonte: Adaptado de Bugay (2008).

3.3.3 Propriedades dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são um grupo bem diversificado de biomoléculas, principalmente devido à vasta gama de microrganismos produtores e a diversidade de substratos nutritivos que podem ser utilizados. Tais fatores promovem a produção de biomoléculas com propriedades superiores aos surfactantes químicos, tornando-os mais atrativos (ARAÚJO et al., 2019).

Entre as propriedades funcionais desses bioprodutos destaca-se a atividade emulsificante, atividade tensoativa, solubilização, tolerância à temperatura, pH e força iônica, desemulsificação, baixa toxicidade, inibição a corrosão, biodegradabilidade, complexação de metais e redução da viscosidade de óleos pesados (OLIVEIRA, 2010).

Atividade tensoativa: os biossurfactantes dividem preferencialmente a interface entre fluidos com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio tais como (óleo/água) ou (ar/água) interfacial. Essa propriedade de se manter na interface proporciona aos mesmos a capacidade de redução da tensão superficial e interfacial formando microemulsões nas quais há possibilidade de hidrocarbonetos solubilizar-se em água ou a água se solubilizar em hidrocarbonetos. Os biossurfactantes reduzem a tensão superficial para valores muito baixos em torno de 30 mN/m e interfacial (óleo/água) em torno de 1mN/m (BUENO, 2008). Conferindo capacidade superior aos surfactantes convencionais. Segundo Mulligan (2004) um

bom surfactante tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água para em torno de 35 mN/m.

Atividade emulsificante: relaciona-se diretamente com a capacidade de forma emulsões e estabilizá-las. Emulsões são caracterizadas por um sistema heterogêneo composto de pelo menos uma fase imiscível ou parcialmente miscível dispersa em outra fase contínua em forma de glóbulos. Essa é uma propriedade fundamental em processos de degradação de hidrocarbonetos em ambientes aquosos ou em solos (DIAS, 2019).

Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, tal característica possibilita o emprego em ambientes com condições drásticas. Os biossurfactantes suportam concentrações salinas de 2 a 3% capazes de inativar surfactantes convencionais e concentrações de até 10% de NaCl (DIAS, 2019).

Baixa toxicidade: os biossurfactantes vem se destacando devido a sua baixa toxicidade, tornando possível sua aplicação em indústrias como farmacêutica, de alimentos e cosméticos. Tais produtos têm contato direto com o corpo humano e não é interessante que ocorra efeitos adversos (DIAS, 2019). Por serem comprovadamente compostos que não causam danos aos seres vivos, o emprego desses compostos sem restrições em indústrias de cosméticos, alimentos e farmacêutica torna-os atrativos (ROCHA, 2017).

Biodegradabilidade: são compostos de fácil degradação, tal característica os torna uma excelente opção para processos de biorremediação e dispersão de óleo em leitos aquosos (SILVA, 2023).

Essas biomoléculas podem ser sintetizadas por substratos renováveis. Além de possuir uma grande diversidade química, proporcionando aplicações específicas para cada caso particular (DIAS, 2019).

3.3.4 Aplicações dos biossurfactantes

Como possuem propriedades superiores aos surfactantes comerciais (Tabela 3.2), os biossurfactantes são recomendados para aplicações em alimentícia, cosmética, farmacêutica e para processos de proteção ambiental (BUGAY, 2009). Mas não somente para tais, podendo ser aplicados em diversas atividades industriais como: indústria do petróleo em processos de recuperação avançada (MEOR – *Microbes for Enhance of Oil Recovery*), na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, agricultura para formulação de herbicidas e

pesticidas, vestuário, emulsões, floculação, indústria de tintas, tratamento e processamento de metais e processamento de polpas de papel (BUENO, 2008).

Tabela 3.2 – Principais aplicações comerciais de biossurfactantes

Funções	Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Mistura carvão-água, calcário-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: (NITSCHK e PASTORE, 2002)

A aplicação do biossurfactante é ponto determinante de todo o seu processo *downstream*, porque dependendo da aplicação no qual o biossurfactante é destinado, o grau de pureza e concentração após a produção deverá ter um limite mínimo estabelecido.

Os biossurfactantes além de suas aplicações como tensoativos, possuem relevante aplicação à saúde sendo utilizados no tratamento de várias doenças como agentes terapêuticos e probióticos. A surfactina por exemplo possui sua maior aplicação na área médico-farmacêutica por possuir funções biológicas, como atividade anti-inflamatória, atividade antimicoplasmática, antibacteriana e antiviral, capacidade de reduzir a formação de biofilme e na estimulação na atividade de macrófagos. Essa molécula pode ser considerada uma molécula biologicamente ativa (OLIVEIRA, 2010).

Segundo Vollenbroich et al. (1997), o tratamento de doenças por inflamação respiratórias e doenças do trato urogenital podem ser tratadas por surfactina devido a sua atividade antimicoplasmática. A surfactina é capaz de penetrar o citoplasma de uma membrana o que os antibióticos não conseguem. A surfactina também possui função anticarcinogênica, tal função foi relatada contra o carcinoma de Erlinch, devido sua capacidade de romper a membrana plasmática atingindo o interior da célula assim como a

atividade antiproliferativa em células de câncer de ovários, de próstata, de mama, renal, de cólon, de pulmão e melanomas (ROCHA, 2017).

Do ponto de vista ambiental a surfactina pode ser aplicada em processos de biorremediação de águas e solos contaminados por compostos (FELIX, 2012). Alguns estudos apontam sua aplicação em processos de degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (LAI et al., 2009).

Em processos de recuperação avançada de óleo por microrganismos (MEOR – *Microbes for Enhance of Oil Recovery*), a técnica se baseia na formação de micelas que reduzem a pressão do óleo em relação as paredes do duto, acarretando o aumento da capilaridade e, por fim, facilitando a extração de petróleo (PAIVA, 2023). Yang et al. (2020), conseguiram obter aproximadamente 95% de recuperação de resíduos de óleo bruto de petróleo em uma emulsão e 0,2 g/L de surfactina com etanol 2%, obtendo um óleo recuperado com a fração de água de 0,5%, admitindo uma recuperação satisfatória de óleo (Yang et al., 2020).

3.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

3.4.1 Microrganismos produtores

A produção de biossurfactantes pode ser realizada por uma variedade de bactérias, fungos e leveduras. Dentre as bactérias pode-se citar as pertencentes ao gênero *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rahnella* e *Arthrobacter* (SELVAM et al., 2020).

Para que um microrganismo possa ser empregado em processos industriais deve dispor de algumas características indispensáveis, como: não ser patogênico; possuir elevada taxa de conversão de substrato em produto; rápida liberação e acúmulo de produto no meio, de modo que a recuperação seja facilitada; não exigir de processos de produção complexos e meios de cultivo dispendiosos; ser estável quanto ao comportamento fisiológico e possuir uma produção de substâncias não compatíveis com o processo minimizadas (MAIA NETO, 2021).

3.4.2 *Bacillus subtilis*

O *B. subtilis* por possuir uma ampla capacidade metabólica, encontra-se entre as 40 espécies mais estudadas no campo da biotecnologia. O interesse em estudá-lo surge devido a sua alta capacidade de produção de lipopeptídeos (SILVA, 2023), bastante conhecido como

produtor de metabólitos com propriedades tensoativas. Considerada uma linhagem GRAS (*Generally Regarded as Safe*), não patogênica e tanto ela como seus metabólitos são seguros para o homem e os animais. Devido a essa característica, os produtos obtidos por *B. subtilis* podem ser amplamente aplicados nos setores industriais de alimentos e farmacêuticos (MAIA NETO, 2021).

Os biossurfactantes produzidos por *B. subtilis*, em sua maioria, são da classe dos lipopeptídeos, formados por anéis de oito membros em que o oitavo membro é um ácido graxo com tamanho da cadeia variável e os demais são aminoácidos (AHIMOU et al., 2000).

B. subtilis se replica na faixa de temperatura mesófila de 25 a 37 °C e tem grande aplicabilidade industrial por sua alta capacidade de produzir lipopeptídeos, como a surfactina, esses metabólitos são secretados de forma extracelular o que facilita a recuperação do biossurfactante (ROCHA, 2017).

3.4.3 *Bacillus safensis*

O *B. safensis* produz um biossurfactante com uma mistura de quatro lipopeptídeos e sete aminoácidos incorporados a uma cadeia com 14 carbonos de um ácido graxo, formando uma molécula de biossurfactante semelhante a produzida por *B. pumilus* (ARAÚJO et al., 2019).

É uma bactéria Gram-positiva, mesófila, formadora de esporos quimio-heterotrófica e aeróbica. Sua estrutura é em forma de bastonete e móvel, possui alta tolerância a concentrações de sal, metais pesados e radiações gama e ultravioleta. Tais características identificadas por seu isolamento em *habitats* bem severos para a maioria dos microrganismos (DAS e KUMAR, 2019).

Em estudos envolvendo o uso de *B. safensis* para a produção de biossurfactante, citam-se uma grande aplicabilidade desse bioproduto para recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos e seu emprego para a recuperação avançada de petróleo. Na recuperação de solos contaminados, o biossurfactante produzido pela linhagem *B. safensis* J2 já foi utilizado na remoção de 46,5% de óleo diesel contaminante em solo (DAS e KUMAR, 2019). Apresenta ainda outras finalidades como: para auxiliar na promoção do crescimento de plantas, ajudando na solubilização de fosfato, produção de sideróforo, ácido indol-3-acético e 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase.

Ainda há relatos na literatura com relação a aplicações de linhagens de *B. safensis* na agricultura como agente de biocontrole de doenças em plantas, devido sua capacidade de

produzir efeitos antifúngicos, antibacterianos e antivirais em diversas culturas, impedindo o crescimento de fungos a partir do efeito antagônico entre dois microrganismos impedindo o crescimento, permitindo um controle de doenças causadas por patógenos em plantas sem uso de medicações químicas, tornando sua utilização mais sustentável (LATEEF et al., 2015).

3.4.4 Fatores que influenciam na produção

A produção de biossurfactantes é influenciada por vários fatores como pH, temperatura, agitação e modo de operação, a natureza das fontes de carbono e nitrogênio, a presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio que podem definir a quantidade de biossurfactante produzido e a qualidade do produto gerado (SECATO et al., 2016). Porém, a aplicação dos surfactantes naturais ainda é limitada devido à competição com os surfactantes químicos por causa do alto custo de produção associado com o uso de substratos caros e baixa produtividade. Como indústrias da área petrolífera necessitam de grande quantidade de surfactantes, torna-se uma premissa indispensável surfactantes de baixo custo sejam eles químicos ou naturais (BEZERRA et al., 2012).

O processo de produção de biossurfactantes depende de vários fatores que variam de acordo com os microrganismos utilizado para a produção e a fonte de meio nutritivo. As fontes de nitrogênio são importantes para aumentar a produção de biossurfactantes, dependendo do microrganismo utilizado ele necessita de mais nitrogênio do que se tem disponível em um resíduo agroindustrial (LARINI et al., 2017).

Normalmente, os biossurfactante produzidos por meios sintéticos utilizam sempre uma fonte de carbono, suplementada por fonte de nitrogênio, e em alguns casos íons metálicos, na forma de macro e micronutrientes, em solução nutriente. As principais fontes de nitrogênio utilizadas na produção de biossurfactantes são as de nitrogênio orgânico como extrato de levedura, ureia, triptona, digerido pancreático de caseína, extrato de carne e hidrolisado de caseína ou fontes de nitrogênio inorgânico como NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_3 (LARINI et al., 2017).

3.4.5 Fontes nutritivas alternativas

Os biossurfactantes produzidos por microrganismos a partir de substratos alternativos em processos economicamente viáveis, de alto rendimento, pode ser estratégia possível para

redução de custo de produção. Logo, torná-los competitivos frente aos surfactantes sintéticos e ao mesmo tempo eliminar problemas ambientais devido o descarte e tratamento dos mesmos (BEZERRA et al., 2012).

A eficiência da produção de biossurfactantes está ligada de forma direta ao desenvolvimento de um processo que tenha como premissas básicas o uso de materiais de baixo custo como fonte de nutrientes e com um processo que obtenha alto rendimento no produto de interesse, além de ser apropriado para a reprodução em escala industrial. O emprego de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes em processos de produção de biossurfactantes é uma alternativa viável, pois, em sua maioria, os resíduos agroindustriais possuem os nutrientes necessários, são matérias primas em abundância, que seriam descartadas (ROVINA, EHRHARDT e TAMBOURGI, 2018).

A matéria-prima utilizada na produção representa entre 10 – 30% do custo total de produção de um biossurfactante, essa matéria prima é composta por fontes de carbono, fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais na síntese do biossurfactante na quantidade necessária e desejada. Uma alternativa ao uso de substratos sintéticos é utilizar compostos de baixo custo, por exemplo, a base de resíduos agroindustriais como águas residuais de indústria de laticínios (DAVEREY et al., 2011); glicerina e suco de caju clarificado (FONTES et al., 2012), licor de maceração de milho (LUA et al., 2012), água residuária da produção de farinha de mandioca (NITSCHKE e PASTORE, 2004); ou substratos alternativos com óleo de amendoim, melão de cana-de-açúcar, suco de caju clarificado (LUA et al., 2012) e extrato aquoso da algaroba como fonte de nutrientes (SECATO et al., 2016; DIAS, 2017).

A fonte de carbono é essencial para o rendimento da produção porque os microrganismos produtores de biossurfactantes necessitam dessa fonte para que ocorra a produção, alguns exemplos de fonte de carbono são: hidrocarbonetos como diesel, petróleo, óleos vegetais, glicose, sacarose e resíduos agroindustriais. Os substratos considerados ótimos para a produção são aqueles que possuem elevados níveis de carboidratos e lipídeos com a adequada relação entre carbono e nitrogênio (ROVINA, EHRHARDT e TAMBOURGI, 2018).

Foi constatado o uso como fonte de carbono na produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.* e *Lysinibacillus sp.* diferentes tipos de óleos dentre eles óleo de soja, óleo de frituras e óleo lubrificante novo e usado. Obtendo como resultado uma melhor produção com o óleo de soja do que com o óleo lubrificante (MAIA NETO, 2021).

Pode-se observar o emprego de outras fontes de carbono como a glicose, sacarose, manitol, caldo de cana, frutose e glicose + frutose, empregados por Bueno, Silva e Garcia-Cruz (2010), em diferentes concentrações para produção de biossurfactantes por *B. pumilus*. Obtendo como resultado uma melhor produção utilizando a sacarose seguido pelo uso do caldo de cana (MAIA NETO, 2021). Tais fontes de carbono sintéticas como glicose, manitol e sacarose tornam o processo oneroso por ser matérias primas caras que elevam o custo do processo.

Dentre os substratos alternativos empregados na produção de biossurfactantes podemos citar alguns trabalhos: Produção de surfactina utilizando *B. subtilis* UFPEDA 438 e melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono desenvolvido por Rocha (2017). Produção de biossurfactante por *B. subtilis* utilizando os resíduos do processamento da casca de laranja (ROVINA, 2018). Das e Kumar (2019) testaram diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar para síntese de tensoativos por *B. safensis* J2, obtendo como ótima concentração para bom resultado de produção 4% de bagaço de cana. Das e Kumar (2018) avaliaram também o emprego de bagaço e casca de batata em diferentes condições de cultivo utilizando *Pseudomonas azotoformans* AJ15 (MAIA NETO, 2021). Um meio composto por soro de leite, manipueira e óleo de soja pós-fritura foi avaliado por Ribeaux (2016) para a produção de tensoativos por *Candida tropicalis*, obtendo como melhor composição para esse meio 3% de soro de leite, 7% de manipueira e 10% de óleo de soja pós fritura. Águas residuais da produção de farinha de mandioca foram utilizados por Fernandes (2016) como substrato para a produção de biossurfactantes utilizando *Penibacillus* sp. (MAIA NETO, 2021).

De certa forma, a aplicação desses substratos alternativos na produção de biossurfactantes é uma opção interessante por dar uma destinação mais nobre ao mesmo tempo que torna relação custo-benefício promissora na produção de biossurfactantes (MANO, 2008).

3.4.6 Processos de produção

Os principais processos biotecnológicos utilizados na produção de metabólitos a partir de microrganismos são a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). A principal diferença entre esses dois processos está na quantidade de água presente no meio, no qual em fermentação submersa os meios são dissolvidos em água e em fermentação em estado sólido é caracterizado pela ausência ou quantidade mínima de água

livre, apenas o suficiente para manter o teor de umidade do meio entre 30 a 70 % (BUGAY, 2008).

Na produção de biossurfactantes o processo mais utilizado é a fermentação submersa (FS) tanto em escala de bancada como em escala industrial. Em sua maioria, a produção de biossurfactantes, em FS, é acompanhada pela avaliação do sobrenadante (meio fermentado isento de células) quanto ao índice de emulsificação e à tensão superficial, ao teor de açúcares e, por fim, passam por técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise dos biossurfactantes (BUGAY, 2008). Um exemplo da produção industrial de biossurfactantes é a produção em fermentação submersa de surfactina utilizando *B. subtilis* pela Empresa Sigma-Aldrich, hoje gerenciada pela alemã Merck (KRIEGER et al., 2009).

3.5 CONDIÇÕES OPERACIONAIS

O rendimento da produção de biossurfactantes é influenciado por parâmetros operacionais do processo como a temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, grau de aeração, velocidade de agitação do processo e pH. Tais parâmetros afetam diretamente o crescimento celular dos microrganismos, consequentemente, a produção de surfactina.

Os biossurfactantes do tipo lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. são sintetizados na faixa de 25 a 37°C de temperatura. Portanto, fazendo-se necessário um controle da temperatura de processo a fim de se obter o maior rendimento possível na produção do biossurfactante de interesse (LARINI et al., 2017).

Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) concluíram que para obtenção de uma melhor produção de surfactina por *B. subtilis* é necessário um meio saturado com 30% de oxigênio dissolvido. Outros estudos demonstraram que a velocidade de agitação do meio afeta a produção, pois em processos com agitação superior a 250 rpm houve um grande acúmulo de espuma, que ocasionou uma redução da transferência de oxigênio. A partir de testes foi possível determinar que com velocidades de agitação entre 200 e 250 rpm obteve-se a faixa ótima de manutenção do oxigênio dissolvido acarretando uma maior produção do biossurfactante (LARINI et al., 2017).

O pH é um fator importante na produção de surfactina. Segundo Wei e Chu (1998) a manutenção de um valor de pH constante facilitou a produção de surfactina em grandes quantidades. Alguns pesquisadores como, Sen e Swaminathan (1997) determinaram através

da avaliação de produção de surfactina com pH entre 6 e 9 que o valor de pH que se obteve maior rendimento na produção de surfactina foi em pH 6,75 constante durante o processo.

Outros fatores afetam a produção de biossurfactantes, o tempo de adaptação do microrganismo ao meio afeta diretamente a fase lag do processo, a taxa de velocidade específica de crescimento e a concentração de biomassa.

3.6 CINÉTICA DE PRODUÇÃO

Os estudos cinéticos de processos fermentativos são a análise matemática dos dados obtidos no processo, ou seja, a evolução dos valores de concentração de componentes do sistema em relação ao tempo de processo. Em processos fermentativos, as variações de concentrações estudadas são o crescimento de células (X), a formação dos produtos (metabólitos) (P) e o consumo dos substratos (S) em função do tempo. A cinética permite a comparação de diferentes formas de cultivos e através do estudo pode ser traçado a melhor condição de cultivo (temperatura, pH, velocidade de agitação e taxa de aeração) (SCHMIDELL et al., 2001).

Uma determinação de velocidade do processo com foco prático na avaliação do desempenho do processo fermentativo é a produtividade em células, definida por Equação (3.1):

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (3.1)$$

Em que: P_x – representa a produtividade em células [g/L.h]; X_m – representa a concentração máxima de células [g/L]; X_0 – representa a concentração inicial de células [g/L]; e t_f – representa o tempo de processo (SCHMIDELL et al., 2001).

A mesma definição acima é aplicada para a concentração de produto ao longo do processo, sendo denominada produtividade em produto Equação (3.2):

$$P_p = \frac{P_m - P_0}{t_{fP}} \quad (3.2)$$

Em que: P_p – representa a produtividade em produto [g/L.h]; P_m – representa a concentração máxima de produto [g/L]; P_0 – representa a concentração inicial de produto [g/L]; e t_{fP} – tempo que o produto é formado (SCHMIDELL et al., 2001).

No decorrer do processo fermentativo, a concentração celular aumenta, portanto, é possível quantificar a velocidade específica de crescimento (μ_x), (SCHMIDELL et al., 2001), utilizando a Equação (3.3).

$$\mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3.3)$$

Durante a fase exponencial de crescimento microbiano, a velocidade específica é máxima e constante ($\mu_{m\acute{a}x}$). Esse $\mu_{m\acute{a}x}$ pode ser obtido pela linearização dos valores de concentração celular durante a fase exponencial (SCHMIDELL et al., 2001). Ainda, pode-se determinar o tempo de geração (t_g) da linhagem durante o cultivo através da Equação (3.4).

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (3.4)$$

O tempo de geração (t_g) é o tempo necessário para dobrar a concentração inicial celular, considerando a velocidade específica máxima de crescimento celular (SCHMIDELL et al., 2001).

É possível quantificar no cultivo os fatores de conversão. Em relação a concentração de substrato (S), a concentração de células (X) e a concentração de produtos (P), tem-se o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) Equação (3.5), fator de conversão de células em produto ($Y_{X/P}$) Equação (3.6) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) Equação (3.7) descrito por SCHMIDELL et al. (2001).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3.5)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad (3.6)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (3.7)$$

Em que:

$Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em células [g_x/g_s];

$Y_{X/P}$ – Fator de conversão de células em produto [g_x/g_p];

$Y_{P/S}$ – Fator de conversão de substrato em produto [g_p/g_s];

X – Concentração final de células [g/L];

X_0 – Concentração inicial de células [g/L];

S_0 – Concentração inicial de substrato [g/L];

S – Concentração final de substrato [g/L];

P – Concentração final de produto [g/L];

P_0 – Concentração inicial de produto [g/L].

3.7 PROCESSOS DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Os processos biotecnológicos são divididos, de maneira geral, em três etapas principais: *upstream* que corresponde a seleção dos microrganismos, ao preparo e caracterização do substrato a ser utilizado no processo; *central point* ou processo, onde ocorre o contato entre os agentes produtores representados pelos microrganismos com o substrato a ser utilizado, ou seja, toda biotransformação do substrato em produto que ocorre em um biorreator e *downstream* onde são realizados os processos de recuperação, purificação e concentração dos bioprodutos oriundos do metabolismo do microrganismo (MANO, 2008). Essa etapa é geralmente muito complexa tornando o produto final muito caro, para a maioria dos processos biotecnológicos, as etapas de *downstream* são responsáveis por 60% dos custos da produção.

Na determinação dos processos de recuperação e purificação de biossurfactantes é preciso atenção à estrutura do biossurfactante produzido e suas propriedades, porque um processo muito eficiente para um determinado biossurfactante pode não ter uma boa eficiência na recuperação de outra biomolécula. Compostos como a surfactina que são amplamente estudados na literatura, possuem por exemplo um processo de alto rendimento. Normalmente, utiliza-se para recuperação desse bioproduto um processo de precipitação ácida com HCl, seguida por um processo de extração líquido-líquido, utilizando como solventes para extração o metanol, clorofórmio ou diclorometano (DIAS, 2019).

A purificação de bioprodutos como os biossurfactantes é a última etapa antes da sua aplicação. Na maioria dos casos é o passo essencial na cadeia de recuperação. Esses processos têm diferentes níveis e dependendo do grau de pureza exigido no produto final, o custo dos processos será muito alto e possui baixo rendimento em produto. Nesse caso essa etapa é restrita a processos de sorção como adsorção e cromatografia (MANO, 2008).

3.7.1 Precipitação ácida

O processo de precipitação em recuperação de bioprodutos é uma técnica bem estabelecida e muito aplicada em recuperação de biossurfactantes da classe dos lipopeptídeos, produzidos por *B. subtilis* devido a insolubilidade desses biossurfactantes a baixos valores de pH (DESAI e BANAT, 1997; MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; SEN e SWAMINATHAN, 2005; COSTA, 2005; YEH et al., 2006; BARROS, 2007). Nos processos de precipitação a solubilidade é reduzida pela adição de solventes orgânicos ou sais. É uma prática que utiliza ácidos fortes como HCl, e tem como vantagem a simplicidade do processo, portanto, permite fácil ampliação em escala (MANO, 2008).

Uma característica da surfactina que torna possível o emprego da precipitação ácida como etapa de recuperação do bioproduto é a dependência das propriedades surfactantes em relação a variação de pH. Ao reduzir o pH do meio contendo surfactina para um pH próximo de 2 ocorre uma elevação da tensão superficial para 62 mN/m, e após neutralização do sistema a tensão retorna a 27mN/m, essa característica constitui uma vantagem adicional a surfactina porque mesmo em condições extremas de pH a sua estrutura química é mantida. A alteração das propriedades surfactantes em meio ácido se dá devido a surfactina ter a tendência de precipitar por causa da perda de solubilidade da molécula ao ser protonada. Quando o pH do meio volta ao valor original o biossurfactante sofre desprotonação tornando-se solúvel ao meio novamente (ROCHA, 2017).

A precipitação ácida é um dos métodos mais tradicionais e com fácil execução, que atinge um fator de recuperação alto (>97%), mas apresenta como desvantagem um grau de pureza baixo do bioproduto (<60%), sendo necessário outras etapas de purificação (DOBLER et al., 2022). Portanto, a precipitação para recuperação de biossurfactantes é considerada um processo de baixa resolução, tendo a necessidade de utilizar outros sistemas de recuperação e purificação de bioproduto para conferir mais alto grau de pureza.

3.7.2 Extração por solvente

A extração por solvente é uma das operações unitárias mais versáteis na recuperação de bioprodutos em processos biotecnológicos, é mais aplicada em recuperação de metabólitos secundários lipofílicos, por exemplo. Sendo considerada mais uma técnica de enriquecimento ou concentração de recuperado do meio de produção do que uma técnica de purificação mesmo que uma certa purificação substancial seja atingida (BANAT, 1995).

A extração por solvente é utilizada normalmente como uma operação intermediária de recuperação no processamento de bioprodutos, facilitando a concentração e purificação. A recuperação a partir desse método depende tanto da polaridade da biomolécula quanto da polaridade do solvente utilizado. A surfactina é solúvel, principalmente, em solventes polares e parcialmente em solventes não polares (DOBLER et al., 2022).

Uma variedade de solventes orgânicos pode ser empregada nessa técnica, isoladamente ou em combinação, como: metanol, etanol, acetato de etila, butanol, éter dietílico, n-hexano, acetona, n-pentano, ácido acético, diclorometano e clorofórmio. Entre esses a combinação de clorofórmio com metanol em diferentes proporções é o solvente mais eficaz por facilitar o ajuste de polaridade do agente extrator para o composto alvo (DOBLER et al., 2022).

As principais vantagens do emprego de processos de extração por solventes orgânicos estão na eficiência na recuperação de biossurfactante e em sua purificação parcial obtida pelo processo. Porém, a grande desvantagem desse processo é o não emprego em processos de larga escala devido a inviabilidade de montar-se equipamentos grandes para esse processo e os elevados custos em relação aos solventes empregados (MANO, 2008).

3.7.3 Cromatografia

Os processos de purificação de biossurfactantes, geralmente, baseiam-se em etapas cromatográficas, que confere elevado grau de pureza da biomolécula alvo, além de uma alta e eficiente recuperação. Em processos cromatográficos, os biossurfactantes ficam aderidos inicialmente a coluna cromatográfica e posteriormente são eluídos a partir da solução tampão apropriada (MANO, 2008).

O emprego da cromatografia tem como objetivo de purificar a biomolécula, além de quantificar o biossurfactante ao final do processo. Alguns estudos são relatados que empregam a cromatografia por interação hidrofóbica em biossurfactantes de *Streptococcus thermophilus* (RODRIGUES et al., 2006), a cromatografia de adsorção e cromatografia por troca iônica aplicadas a purificação de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* (REILING et al., 1986), além do uso de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) aplicada a purificação e quantificação de surfactina produzida por *B. subtilis* (MULLIGAN e GIBBS, 1990; LIN et al., 1997; LIN et al., 1998).

3.8 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

3.8.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com refletância total atenuada (ATR).

Uso da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma análise bem estabelecida, sendo amplamente aplicada em áreas como indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética, classificação de produtos agrícolas, monitoramento ambiental e segurança médica. Essas aplicações ocorrem devido as vantagens da técnica como rapidez, não destrutividade, precisão, eficiência e possuir uma fácil preparação de amostra (ZHENG et al., 2022).

O emprego da metodologia da refletância total atenuada (ATR) em análises de (FT-IR) para biossurfactantes é vantajoso por permitir análise do biossurfactante em meio líquido sem a necessidade de secagem após a recuperação e posterior preparo de pastilhas (HIGGINS e REIN, 2021).

4 METODOLOGIA

4.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados no processo de produção de biossurfactantes foram do gênero *Bacillus*, linhagens *B. subtilis* UFPEDA 16 fornecida pelo Departamento de Antibióticos da UFPE e *B. safensis* – Linhagem 28 fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da UFPB. Todas as linhagens foram mantidas em meio Ágar-LB (Luria-Bertani) (triptona 10g/L; extrato de levedura 5g/L; cloreto de sódio 5g/L; ágar 10g/L) com repiques periódicos.

Na Figura 4.1 pode-se observar a linhagem de *B. safensis* 28 em meio manutenção com 24 horas de incubação a 37°C, e já a Figura 4.2 pode-se observar a linhagem de *B. subtilis* UFPEDA 16 em meio de manutenção com 24 horas de incubação a 37°C, ambas linhagens foram mantidas regularmente em meio Ágar-LB.

Figura 4.1 – *Bacillus safensis* 28



Figura 4.2 – *Bacillus subtilis* UFPEDA 16



4.2 SUBSTRATO

O substrato utilizado para produção de biossurfactantes foi o extrato aquoso da algaroba. A obtenção do extrato aquoso da algaroba foi realizada em trabalhos anteriores (DIAS, 2017; DIAS, 2018) do grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB. O extrato aquoso obtido foi armazenado em recipientes plásticos e conservados em temperatura de -20°C. As

vagens de algaroba utilizadas para extração do caldo foram coletadas em algarobeiras da cidade de Japi-RN, localizada na microrregião do semiárido potiguar.

4.2.1 Caracterização físico-química do substrato

Para determinar a composição do extrato aquoso da algaroba para produção de biossurfactantes foram realizadas as seguintes análises: determinação do teor de açúcares totais (ART) , medição do teor de sólidos solúveis (°Brix) e pH.

4.2.1.1 Teor de açúcares redutores totais

A determinação do teor de açúcares redutores totais (ART) foi realizada a partir da hidrólise ácida da amostra do extrato aquoso da algaroba. Em um tubo foi adicionado uma alíquota de 1,0 mL do extrato aquoso da algaroba e 0,5 mL de solução a 2,0 M de HCl. Essa mistura foi colocada em banho termostatizado (SevenLabor) a 70°C por 10 minutos. Após realizada a hidrólise, o conteúdo do tubo foi colocado em balão volumétrico de 50mL e a ele foram adicionados 6,0 mL de água destilada e 2,0 mL de solução de NaOH a 4,0M, após neutralização da mistura, completou-se o volume do balão volumétrico com água destilada.

A etapa subsequente foi o preparo da amostra para análise de quantificação de ART, em tubo foi adicionado uma alíquota de 0,5mL de amostra hidrolisada com 0,5 mL do reagente DNS. Essa mistura foi colocada em banho termostatizado (SevenLabor) por 5 minutos a 100°C. Após o aquecimento adicionou-se 4,0 mL de água destilada, e por fim, foi realizada a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão foi obtida utilizando diferentes diluições da solução-estoque de glicose a 1g/L. O branco foi elaborado utilizando 0,5 mL do reagente DNS com 0,5 mL de água destilada, também submetido a processo de aquecimento (10 minutos a 100°C) e adição de 4,0 mL de água destilada, estabelecendo a mesma proporção das amostras de análise, conforme metodologia de Santos (2007). Todo o processo foi realizado em triplicata.

4.2.1.2 Teor de sólidos solúveis (°Brix)

A determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada no Laboratório de Produtos Fermento e Destilados do Departamento de Engenharia Química por meio de um refratômetro de bancada modelo Biobrix (IAL, 1985).

4.2.1.3 pH

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) do extrato aquoso da algaroba foi realizada em um pHmetro de bancada (MS – Tecnocon – mPA-210).

4.3 PREPARO DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Para o preparo do meio para produção de biosurfactantes utilizou-se extrato aquoso de algaroba na concentração de 1% (v/v), utilizando uma concentração de 16,91 g/L e ajuste do pH de 6,8, com adição de HCl ou NaOH (0,2M). Após adequação do pH, o meio foi submetido a filtração a vácuo utilizando filtro de papel de 14 µm para remover material particulado que pode ser visualizado seu aspecto na Figura 4.3, e posteriormente adicionou-se uma alíquota de 100mL de meio em frascos erlenmeyers de 250mL de volume e dispostos na autoclave para esterilização a 121°C por 15 minutos.

Figura 4.3– Meio de cultivo autoclavado com presença de material particulado no fundo do frasco Erlenmeyer.



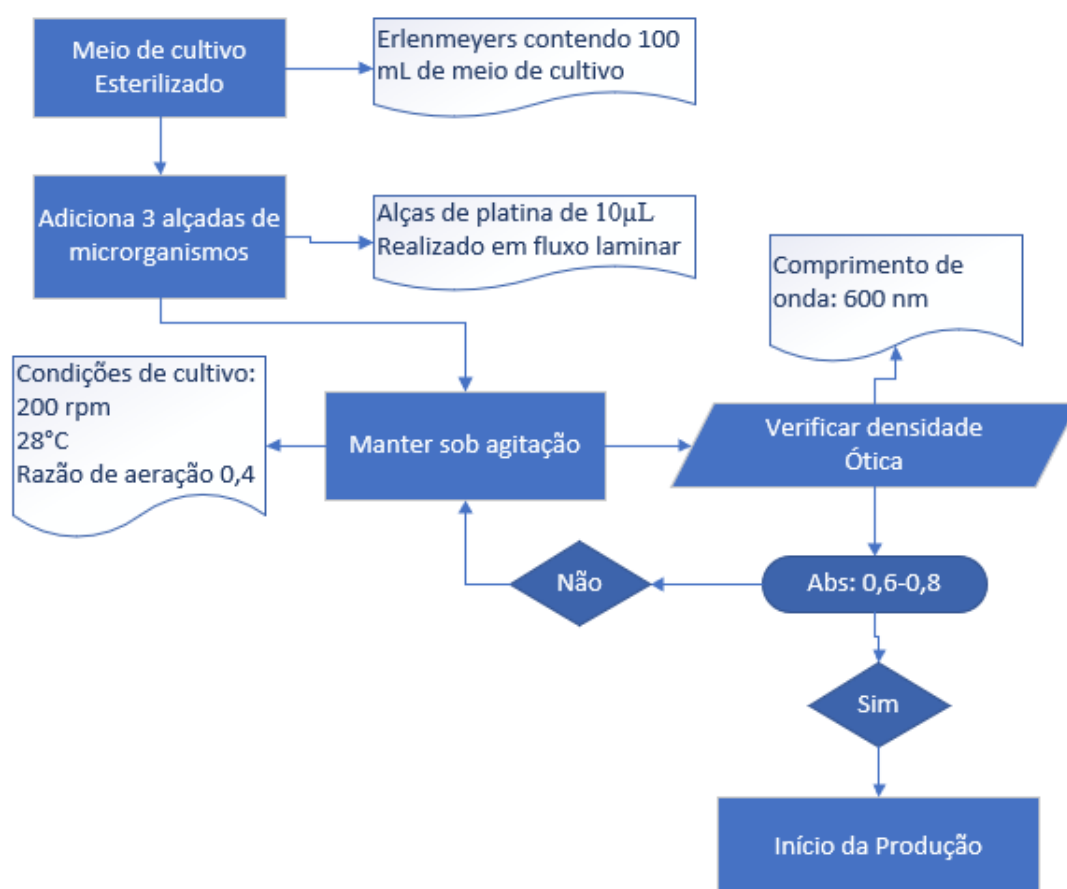
Para a produção do biosurfactante utilizando *B. safensis* 28, o meio de cultura foi adicionado extrato de levedura a 1% (p/v) para suplementação da fonte de nitrogênio. A fim

de avaliar o rendimento em biossurfactante com e sem a suplementação com nitrogênio foi desenvolvido dois ensaios com o *B. safensis* 28. A avaliação foi realizada a partir da primeira produção (P1) com a linhagem *B. safensis* 28 sem suplementação de nitrogênio utilizando o meio de cultivo conforme descrito no item 4.1. Outro ensaio foi realizado para avaliar a segunda produção (P2) em que se utilizou a suplementação da fonte de nitrogênio com extrato de levedura a 1% (p/v) ao meio de cultivo como também descrito no item 4.1.

4.4 PREPARO DO INÓCULO

O processo de padronização do inóculo, demonstrado na Figura 4.4, foi realizado de modo a garantir a quantidade suficiente de microrganismos para o processo de produção de biossurfactantes, ou seja, para que o processo inicie dentro da fase exponencial de crescimento das linhagens utilizadas.

Figura 4.4 – Fluxograma Padronização do Inóculo.

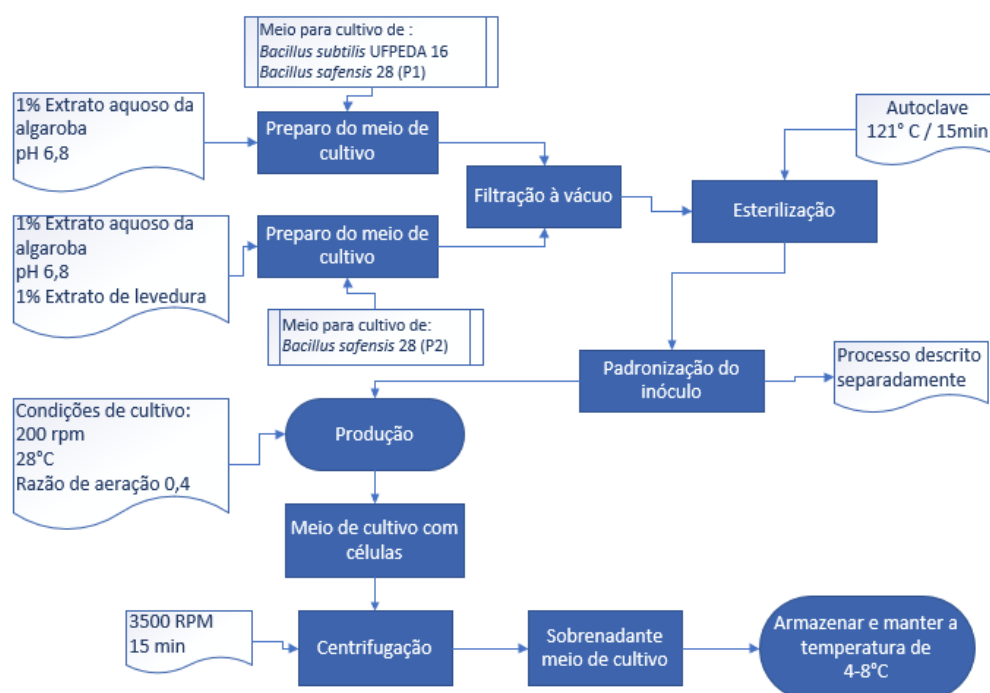


Para o inóculo das linhagens foi utilizado frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de extrato de algaroba a 1% (v/v), esterilizado, no qual foram adicionadas 3 alçadas de platina (volume de 10µL) de microrganismo (*B. safensis* 28 ou *B. subtilis* UFPEDA16) em ambiente esterilizado (cabine de fluxo laminar). Após, o frasco erlenmeyer contendo o microrganismo foi colocado sob agitação, em *shaker*, a 200 rpm e temperatura controlada de 37°C (SOLAB – SL 223), acompanhado o crescimento microbiano por turbidimetria (600nm) em espectrofotômetro (EVEN) até atingir o crescimento ideal para iniciar o processo, para branco do espectrofotômetro foi utilizado meio esterilizado livre de células. Assim, se a leitura da absorbância alcançar uma densidade ótica entre 0,6 e 0,8, o inóculo estará pronto para iniciar o processo de produção.

4.5 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Para produção de biossurfactantes foram utilizadas duas configurações de cultivo: experimentos com extrato aquoso da algaroba a 1% (v/v) para o desenvolvimento de *B. subtilis* UFPEDA 16. Para o *B. safensis* 28 pode ser é menos estudado, portanto menos adaptado a substratos não convencionais, decidiu-se verificar o potencial de crescimento da linhagem em extrato aquoso da algaroba a partir da análise de dois experimentos de produção, um com extrato aquoso da algaroba a 1% (v/v) (P1) e outro contendo a mesma composição de extrato aquoso de algaroba, porém suplementado de extrato de levedura a 1% (p/v) (P2). Vale ressaltar que todos os experimentos foram realizados em duplicata. A configuração dos experimentos de produção de biossurfactantes está representada na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Fluxograma de produção dos biossurfactantes.



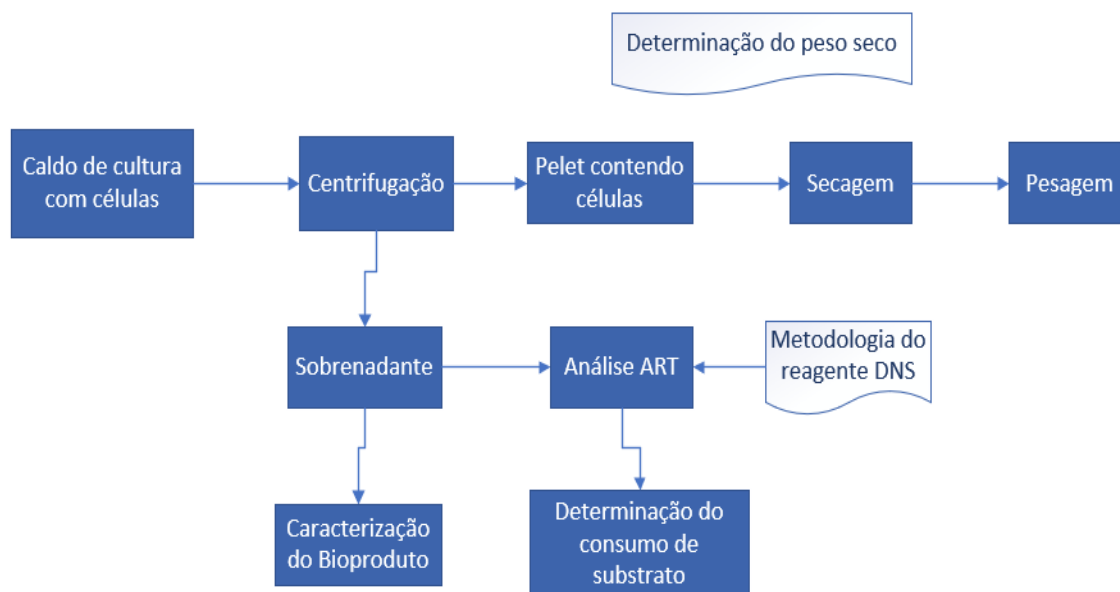
Utilizou-se 4 frascos erlenmeyers de 250mL para cada conjunto de experimentos, com volume de meio de 100mL (obtendo-se a taxa de aeração a partir da relação entre esses dois volumes), em cada frasco, previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos foram inoculados em ambiente esterilizado (cabine de fluxo laminar) com 10% (v/v) do inóculo, ou seja, 10 mL de inóculo em 90mL de meio de cultura, e em seguida levados à incubadora rotativa orbital a 200 rpm e mantidos a 28°C durante 100 horas de cultivo, a cada 12 h de cultivo foi retirado 16 mL de amostras para realização das análises de: quantificação de biomassa (peso seco), capacidade de emulsificação e quantificação de substrato (Método DNS). O caldo produzido foi centrifugado (3500rpm por 15 minutos) para separação das células e o sobrenadante resultante foi colocado em tubos de centrífuga (Falcons) de 50mL, armazenado em temperatura de 4 a 8°C. As condições de cultivo podem ser observadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Condições de cultivo com *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 e *Bacillus safensis* 28.

Parâmetros	Valor	Unidade
Temperatura	37	°C
Agitação	200	rpm
pH	6,8	--
Razão de aeração	0,4	--

Nesses cultivos foram analisados o crescimento microbiano, a concentração de substrato, e a porcentagem de emulsificação. A Figura 4.6 mostra as análises de produção. A quantificação do produto final (biossurfactante) obtido após o processo de cultivo foi realizada utilizando a metodologia do peso seco.

Figura 4.6 – Fluxograma das análises da produção.



4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE

4.6.1 Índice de emulsificação

O poder de emulsificação do biossurfactante foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Na qual utilizou-se dois tubos de ensaio, adicionando dois compostos hidrofóbicos, que foram, óleo de motor e óleo vegetal, respectivamente, com o sobrenadante do cultivo na proporção (2:3). Os tubos foram agitados em um vórtex por 2 minutos e deixados em repouso por 24 h.

O índice de emulsificação em porcentagem após esse período foi calculado a partir da Equação 4.1

$$\text{Índice de emulsificação}(\%) = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura total da coluna}} \times 100 \quad (4.1)$$

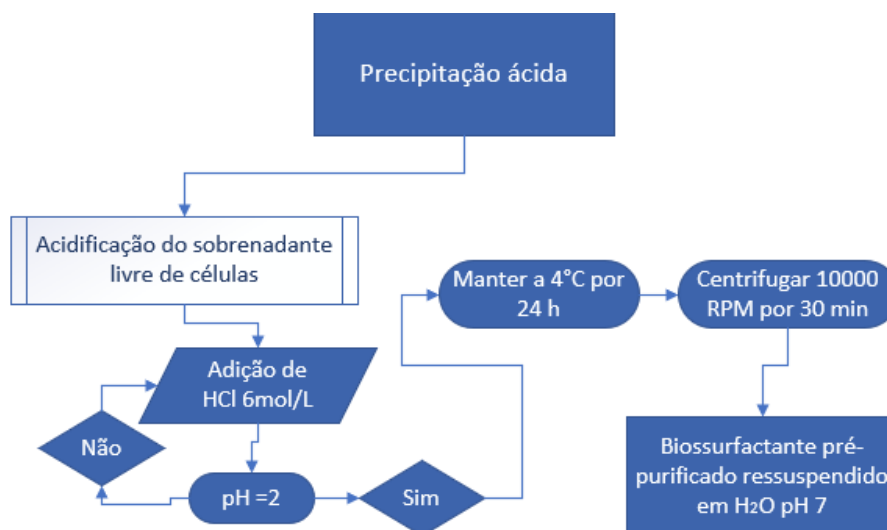
4.7 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

4.7.1 Precipitação ácida para recuperação do bioproduto

O pH dos sobrenadantes dos processos de produção de biossurfactantes por *B. subtilis* UFPEDA 16 e *B. safensis* 28 foi ajustado para 2,0 utilizando HCl 6 mol/L. O processo de acidificação foi realizado com 78 mL de sobrenadante para cada frasco de produção.

O sobrenadante acidificado foi mantido a 4°C por 24h para a precipitação do biossurfactante. O precipitado foi separado por centrifugação a 10.000 rpm por 30 min, o *pellet* formado foi ressuspenso em 25 mL água destilada, com seu pH ajustado para 7,0, com uma solução de NaOH 1 mol/L (GHOJAVAND et al., 2008). O processo realizado está descrito na Figura 4.7.

Figura 4.7 – Fluxograma para recuperação do biossurfactante produzido

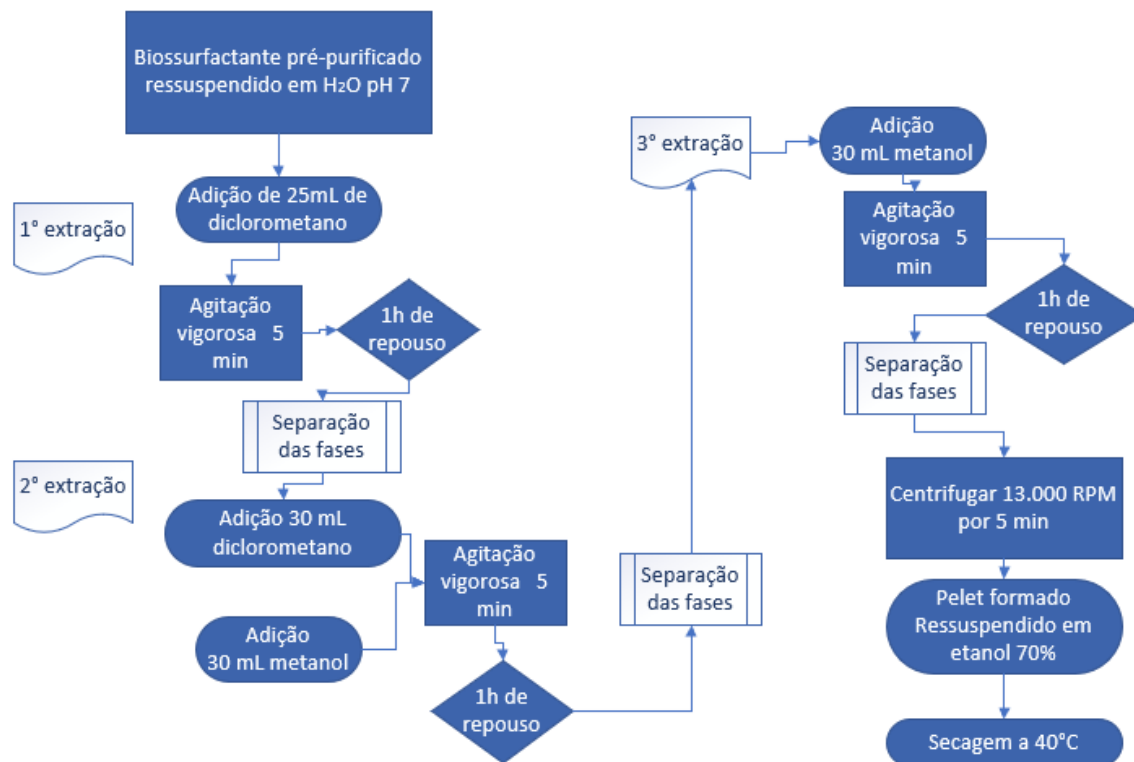


4.7.2 Extração líquido-líquido para recuperação do bioproduto

O biossurfactante precipitado, resultante da acidificação, foi ressuspenso em 25 mL de água destilada para ser submetido à extração líquido-líquido. Primeiramente com diclorometano (CH_2Cl_2) na proporção de (1:1), em seguida a fase mais densa foi submetida a uma segunda extração utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) e por fim uma extração com o metanol CH_3OH (1:1). O solvente recuperado com biossurfactante foi separado por centrifugação a 13.000 rpm por 5 min (MiniSpin, Eppendorf) e ressuspenso em etanol, para ser submetido a

evaporação em estufa a 40°C, obtendo-se a fração residual, denominada extrato bruto. O processo realizado conforme Figura 4.8.

Figura 4.8 – Fluxograma do processo de extração do biossurfactante produzido.



4.8 PURIFICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO

A purificação do biossurfactante produzido foi realizada utilizando um processo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no qual o extrato bruto obtido da etapa de extração líquido-líquido foi passado por uma coluna contendo material adsorvente a fim de conferir o maior grau de pureza ao biossurfactante.

4.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A purificação dos biossurfactantes obtidos pelos dois processos de produção foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo Accela (Thermo Scientific, EUA) utilizando uma coluna cromatográfica Analítica Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 Shimadzu de fase reversa. No processo cromatográfico foi utilizado uma fase móvel com 20% de ácido trifluoracético (3,8 mmol/L) e 80% de acetonitrila na vazão de 1,0 mL/min a 30°C, separação realizada de forma isocrática.

As amostras contendo os lipopeptídeos foram detectadas utilizando um detector de absorção no UV a 205nm. O volume de injeção foi de 20 µL de amostra e o tempo de análise de 30 minutos, seguindo o procedimento descrito por Wei e Chu (1998).

A quantificação das amostras foi realizada por meio de uma curva de calibração com surfactina padrão 95% (Sigma-Aldrich), em uma faixa de concentração de 0,1 a 1,0 mg/mL (ROCHA, 2017).

4.9 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

4.9.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com refletância total atenuada (ATR).

A caracterização dos biossurfactante produzido por *B. subtilis* UFPEDA 16 e *B. safensis* 28 foi realizada utilizando o espectrofotômetro de bancada (Agilent Cary 630 FTIR), que permite uso de amostras líquidas, facilitando o processo de operação do equipamento.

A análise consiste em dispor uma pequena gota de amostra líquida entre duas janelas posicionadas horizontalmente do módulo *DialPath* do equipamento. A distância entre as janelas determina o comprimento do caminho ótico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DO EXTRATO AQUOSO DE ALGAROBA

Devido ao tempo de acondicionamento do substrato utilizado previamente em estudos do grupo de pesquisa por Dias (2017) e Dias (2019), foi realizado o mesmo tipo de avaliação, foi quantificado o teor de açúcares redutores totais (ART), sólidos solúveis (°Brix) e pH. Observando que o extrato aquoso da algaroba apresentou uma quantidade ART de 169,12 g/L e sólidos solúveis totais de 26,5°Brix e pH de 5,11. Tabela 5.1, pode -se observar que houve pouca alteração na quantidade de açúcares presente.

Tabela 5.1 – Características físico-químicas do extrato aquoso da algaroba.

Substrato	Açúcares redutores totais (g/L)	Sólidos solúveis (°Brix)	pH
Extrato aquoso de algaroba	169,12	26,5	5,11

5.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE *Bacillus subtilis* UFPEDA 16

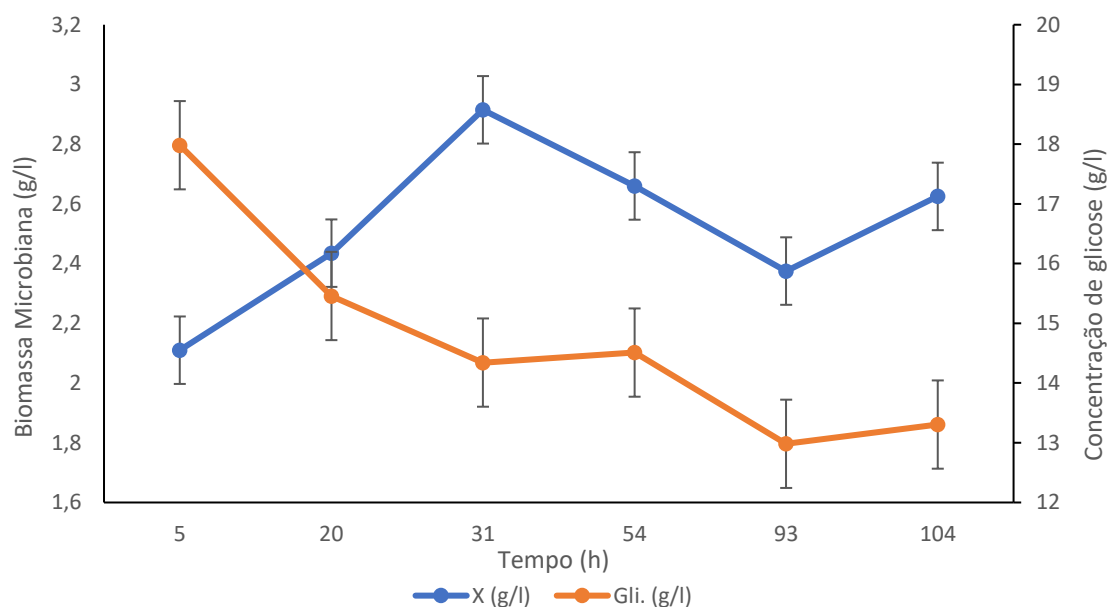
5.2.1 Análise dos parâmetros cinéticos de produção

Os experimentos utilizando *B. subtilis* UFPEDA 16 permitiram avaliar o comportamento em relação ao consumo de substrato, a produção de biomassa e a produção de biossurfactante. A Figura 5.1 que representa o perfil cinético da produção com *B. subtilis* UFPEDA 16, pode-se observar a concentração celular e o consumo de substrato ao longo do processo.

Observou-se um aumento na concentração celular atingindo um valor máximo ($X_{máx.}$) em 31 horas de cultivo com concentração de $2,91 \pm 0,36$ g/L, fator de conversão de substrato em células na fase exponencial ($Y_{x/s}$) de 0,295 g_x/g_s. Em relação ao consumo de substrato, observa-se que em 104 h o cultivo apresenta uma concentração de substrato de 13,31 g/L, dessa forma pode-se estimar que no decorrer da produção houve um consumo de aproximadamente 4,86 g/L de substrato. Entretanto 72,97% dos açúcares presentes no substrato não foram consumidos, inferindo que mesmo com a presença de açúcares em grande

concentração a falta de algum nutriente como o nitrogênio acarreta baixo aproveitamento do substrato. A elevada concentração de açúcares não favorece ao crescimento microbiano.

Figura 5.1 – Perfil da produção por *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 relacionando produção de biomassa e consumo de substrato em relação ao tempo de produção.



A partir do cultivo com *B. subtilis* UFPEDA 16, na Tabela 5.2 pode-se observar uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de $0,0107 \text{ h}^{-1}$ e produtividade em células (P_X) de $8,958 \text{ mg/L.h}$. Com base nas concentrações de células, substrato pode-se determinar o fator de conversão de células em produto de $Y_{P/X}$ $0,071 \text{ g}_P/\text{g}_X$, fator de conversão de substrato em produto de $Y_{P/S}$ $0,016 \text{ g}_P/\text{g}_S$, produtividade em produto de P_P $0,639 \text{ mg/L.h}$ e uma concentração de biossurfactante recuperado de $76,67 \text{ mg/L}$ ao final do processo de produção.

Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos de cultivo com *Bacillus subtilis* UFPEDA 16

Parâmetros Cinéticos	Valor	Unidade
$\mu_{x\text{máx}}$	0,0107	h^{-1}
$Y_{X/S}$	0,295	g_x/g_s
P_X	8,958	mg/L.h
t_g	64,78	h
$Y_{P/X}$	0,071	g_p/g_x
$Y_{P/S}$	0,016	g_p/g_s
P_P	0,639	mg/L.h
[P]	76,67	mg/L

Legenda: $\mu_{x\text{máx}}$ – Velocidade específica máxima de crescimento; $Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em célula; P_X – Produtividade em células; t_g – Tempo de geração; $Y_{P/X}$ – Fator de conversão de células em produto; $Y_{P/S}$ – Fator de conversão de substrato em produto; P_P – Produtividade em produto; [P] – Concentração de biossurfactante.

Ao avaliar os resultados obtidos por Rocha (2017). Produzindo biossurfactante por *B. subtilis* UFPEDA 438 e melaço de cana, como substrato, nas condições de agitação a 200 rpm e razão de aeração 0,4, Tabela 5.3. pode-se observar uma concentração máxima de células ($X_{\text{máx.}}$) de 1,42 g/L, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de 0,206 h^{-1} e ao final da produção com substrato residual de 78%. Enquanto Dias (2017) utilizou meio com 50% (v/v) de extrato aquoso de algaroba e *B. subtilis* UFPEDA 86 obteve-se uma máxima concentração de células ($X_{\text{máx.}}$) em 36 h de cultivo, de 8,4 g/L, Tabela 5.3, no meio suplementado com extrato de levedura. Quando o meio não possuía suplementação com extrato de levedura a concentração máxima obtida foi bem menor, 4,6 g/L em 36 h, quase metade da obtida com a suplementação.

Tabela 5.3 – Comparativo de resultados dos parâmetros cinéticos do presente estudo com a literatura.

	<i>B. subtilis</i> UFPEDA16	DIAS (2019)	FELIX (2012)
	1% E. A.	50% E. A.	4% M. C.
$X_{m\acute{a}x.}$	2,91 g/L	8,4g/L	1,42g/L
$Y_{X/S}$	0,295	–	–
$\mu_{xm\acute{a}x}$	0,0107	–	0,206
P_p	0,639 mg/L.h	–	–

Legenda: $\mu_{xm\acute{a}x}$ – Velocidade específica máxima de crescimento; $Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em célula; $X_{m\acute{a}x}$ – Concentração de células na fase exponencial; P_p – Produtividade em produto; E.A. – Extrato de algaroba; M.C. – melão de cana.

No presente estudo que utilizou *B. subtilis* UFPEDA 16 uma outra linhagem de microrganismo e meio nutritivo com composição diferente, de 1% de extrato aquoso da algaroba, pode-se observar que se obteve um rendimento superior ao obtido por Rocha (2017) utilizando o *B. subtilis* UFPEDA 438 em relação a concentração máxima de células na fase exponencial, porém uma menor velocidade específica máxima de crescimento.

Em relação a produtividade em produto e fator de conversão em relação ao produto não é possível comparação dos resultados obtidos, porque os valores encontrados no presente estudo avaliaram esses parâmetros em relação ao valor de produto ao final do cultivo, não sendo possível avaliação ponto a ponto. Enquanto Rocha (2017) avaliou os dados de produção apenas em relação a fase exponencial de crescimento celular.

Os resultados obtidos no cultivo com *B. subtilis* UFPEDA 16, demonstram que a elevada concentração de açúcares não infere em grande quantidade de biossurfactante produzido tendo em vista que a concentração de substrato utilizado nesse estudo 1% de extrato aquoso da algaroba foi 50 vezes menor que a empregada por Dias (2019) utilizando o *B. subtilis* UFPEDA 86.

Em relação a quantidade de açúcares redutores consumidos no processo, pode-se inferir com base na comparação com os resultados obtidos e resultados encontrados por Dias (2017) e Rocha (2017), que *Bacillus* sp. podem ter sua capacidade de produção reduzida em elevadas concentrações de açúcares. Em estudos posteriores, pode-se investigar o comportamento desse microrganismo frente a concentrações menores que as utilizadas nesse estudo.

5.2.2 Análise da produção do biossurfactante por *Bacillus subtilis* UFPEDA 16

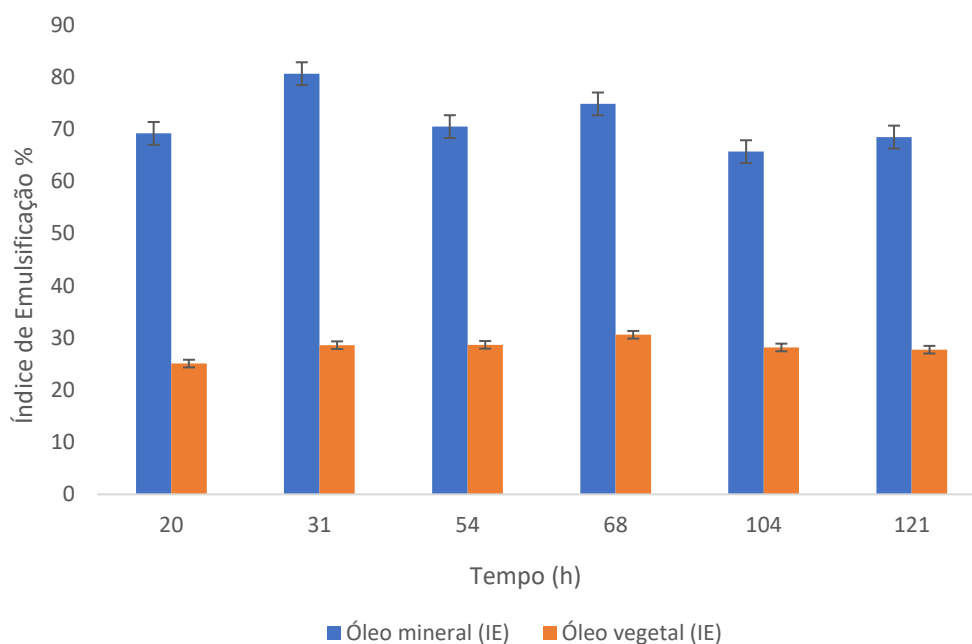
A partir dos resultados apresentados na Figura 5.2, que demonstraram os valores percentuais para índice de emulsificação, pode-se inferir que o biossurfactante produzido possui maior afinidade com moléculas maiores de hidrocarbonetos como e o caso do óleo lubrificante. Essa afirmação pode ser comprovada a partir do estudo de Barros et al. (2007) no qual constataram que a surfactina principal biossurfactante produzido por *B. subtilis* é formado por sete aminoácidos ligados a um ácido graxo β -hidroxi com cadeia carbônica de 13 a 15 carbonos. Como a surfactina possui uma longa cadeia carbônica terá mais facilidade em interagir com compostos mais pesados. Em contrapartida, a emulsificação em relação ao óleo vegetal foi bem menor.

Pode-se observar que em relação ao óleo lubrificante (mineral) obteve-se valores de emulsificação variando de 65,7% a 80,65%, constatando que houve uma produção de biossurfactante e que em média durante o período da produção pode ser observado um aumento no índice de emulsificação à medida que o tempo de cultivo aumentava.

O índice de emulsificação do biossurfactante ao final da produção demonstrou que o biossurfactante produzido tem eficiência de emulsificação de aproximadamente 80,65%. Portanto, o biossurfactante produzido tem uma alta capacidade de emulsificação de emulsões com óleo lubrificante comprovado pelos altos índices de emulsificação obtidos.

Em relação ao índice de emulsificação com o óleo vegetal, pode-se observar que a menor afinidade da molécula de biossurfactante ocasionou uma menor emulsificação da coluna biossurfactante/óleo obtendo valores de emulsificação em torno de 25,07% a 30,59%. Ao comparar com a taxa de emulsificação para o óleo mineral infere-se que o biossurfactante produzido tem características emulsionantes similares da surfactina.

Figura 5.2 – Índice de emulsificação (24h) com óleo lubrificante mineral e óleo vegetal para o biossurfactante obtido na produção por *Bacillus subtilis* UFPEDA 16.



As análises realizadas nas produções com *B. subtilis* UFPEDA 16 apresentaram uma elevada capacidade do biossurfactante produzido em estabilizar emulsões com compostos de cadeia longa, comprovadas pela capacidade de emulsificação de 80,65% que comprova o alto potencial de emulsificação dos biossurfactantes produzidos.

Os resultados obtidos são relevantes para diversas aplicações, tendo em vista que a capacidade de emulsionar é de suma importância na solubilização de compostos hidrofóbicos em processos de biorremediação (MIHELICIC et al., 1993; VOLKERING et al., 1995), na remoção de óleo retido em borras oleosas (BANAT et al., 1991), na recuperação avançada de petróleo (BANAT, 1995), entre outras aplicações.

De acordo com Barros et al. (2008), a diferença de comportamento entre a emulsão formada com o óleo lubrificante e a observada com o óleo vegetal pode ser explicada pela diferença de massa molecular, como o óleo lubrificante apresenta massa maior que a do óleo vegetal, sugere-se que o biossurfactante tem melhor capacidade de emulsificar compostos de cadeia longa.

Tabela 5.4 – Comparativo de resultados de índice de emulsificação do presente estudo com a literatura.

	<i>B. subtilis</i> UFPEDA16	DIAS (2019)	FELIX (2012)
	1% E. A.	50% E. A.	4% M. C.
Óleo mineral	80,65%	83,01%	–
Óleo vegetal	30,59%	61,21%	–
Óleo diesel	–	–	67,5%

Legenda: E.A – Extrato aquoso da algaroba; M.C – Melaço de cana de açúcar

O biossurfactante produzido por *B. subtilis* UFPEDA 16, Tabela 5.4, quando em contato com óleo lubrificante, obteve um comportamento bem similar ao obtido por Dias (2019) que ao produzir biossurfactante com linhagem de *B. subtilis* UFPEDA 86, utilizando extrato aquoso da algaroba como meio nutritivo, um índice de emulsificação em 24 e 72 horas de cultivo respectivamente, de 83,01% e 72,96%. Resultado bem similar ao comportamento do biossurfactante produzido com *B. subtilis* UFPEDA 16. Comprovando a produção de biossurfactante e sua alta capacidade de emulsificação. Pode-se ainda listar os valores obtidos por Felix (2012) ao emulsificar diesel com biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005 com capacidade de emulsificação de 67,5%.

Em relação ao óleo vegetal pode-se concluir que o biossurfactante produzido não possui capacidade de emulsificação aceitável. Observando os resultados obtidos por Dias (2019), no qual obteve a partir de *B. subtilis* UFPEDA 86, utilizando o mesmo meio nutritivo, resultados bem superiores com índice de emulsificação 61,21% e 56,36% em 24 e 72 horas de cultivo respectivamente.

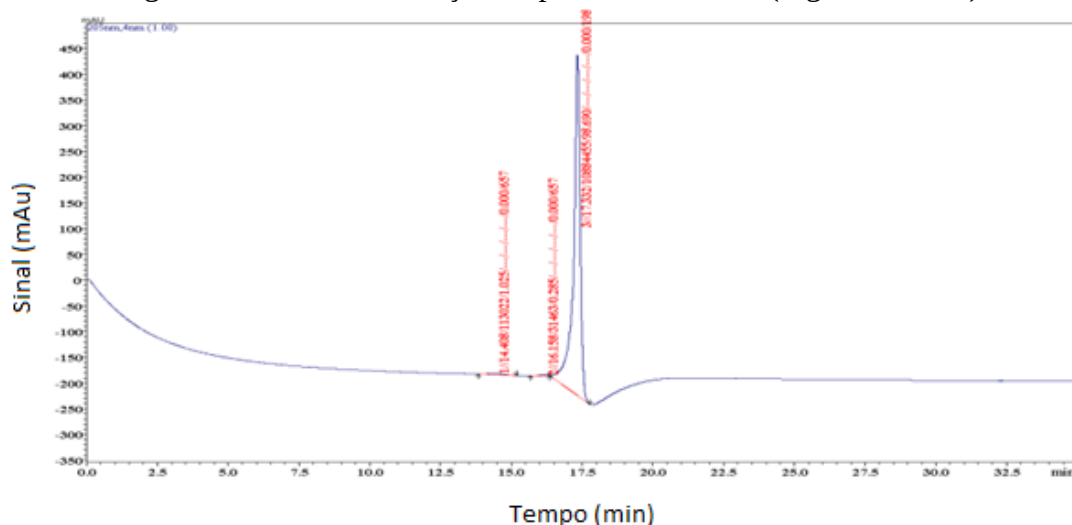
5.2.3 Processos de purificação de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UFPEDA 16

5.2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Primeiramente foi realizado uma análise com o padrão surfactina, Figura 5.3. Pois normalmente o *B. subtilis* produz biossurfactantes do tipo lipopeptídeos, em específico, a surfactina. Ao analisar o cromatograma pode-se observar que o tempo de retenção da

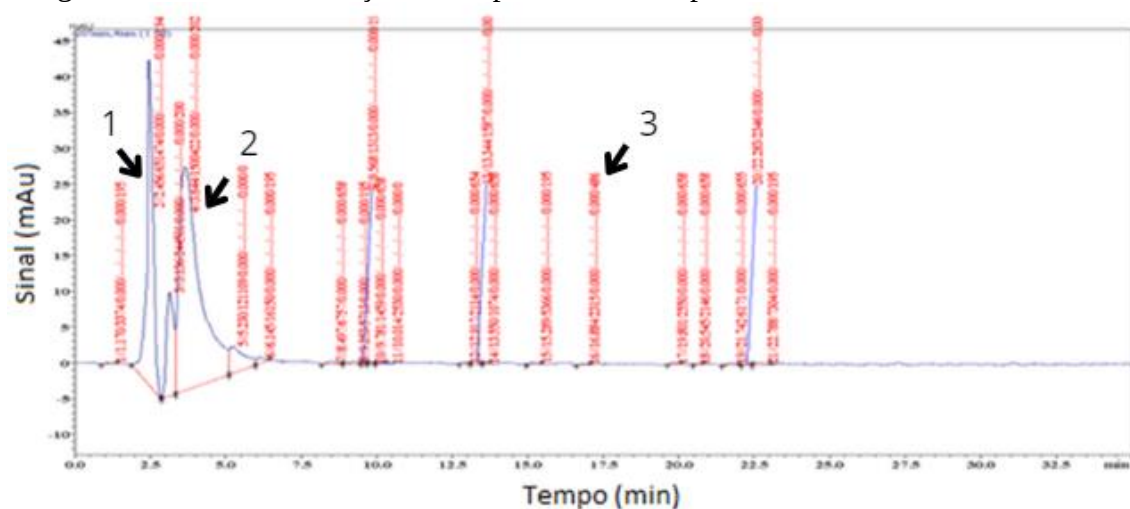
surfactina é de aproximadamente 16,5 – 17,5 min, permitindo assim a comparação com os cromatogramas da amostra de bioproduto.

Figura 5.3 – Perfil de eluição do padrão surfactina (Sigma-Aldrich)



Pode-se observar que no cromatograma Figura 5.4, obtido pela eluição do bioproduto, que na amostra avaliada foi detectado diversos compostos e também que a maior concentração biossurfactantes teve baixo tempo de retenção na coluna. Aproximadamente 2,5 a 5 min, enquanto os outros compostos com concentrações menores foram detectados em diferentes tempos de retenção.

Figura 5.4 – Perfil de eluição do bioproduto obtido por *Bacillus subtilis* UFPEDA 16



É possível a identificação da presença da surfactina indicado por o pico 3 da Figura 5.4, porém devido a concentração de biossurfactante produzido e recuperado pelo processo proposto ser bem baixa em comparação a concentração da surfactina padrão utilizada o

cromatograma do biossurfactante não indica grande concentração de surfactina que pode estar muito diluída ou até mesmo impregnada com impurezas como o metanol.

Ao comparar os cromatogramas obtidos foi possível constatar que no mesmo tempo de retenção do padrão de surfactina foi identificada presença de baixas concentrações de compostos, que infere produção de surfactina, porém a sintetização de outros lipopeptídeos podem ter sido favorecidas devido algum parâmetro do processo produtivo ou pelo meio nutritivo.

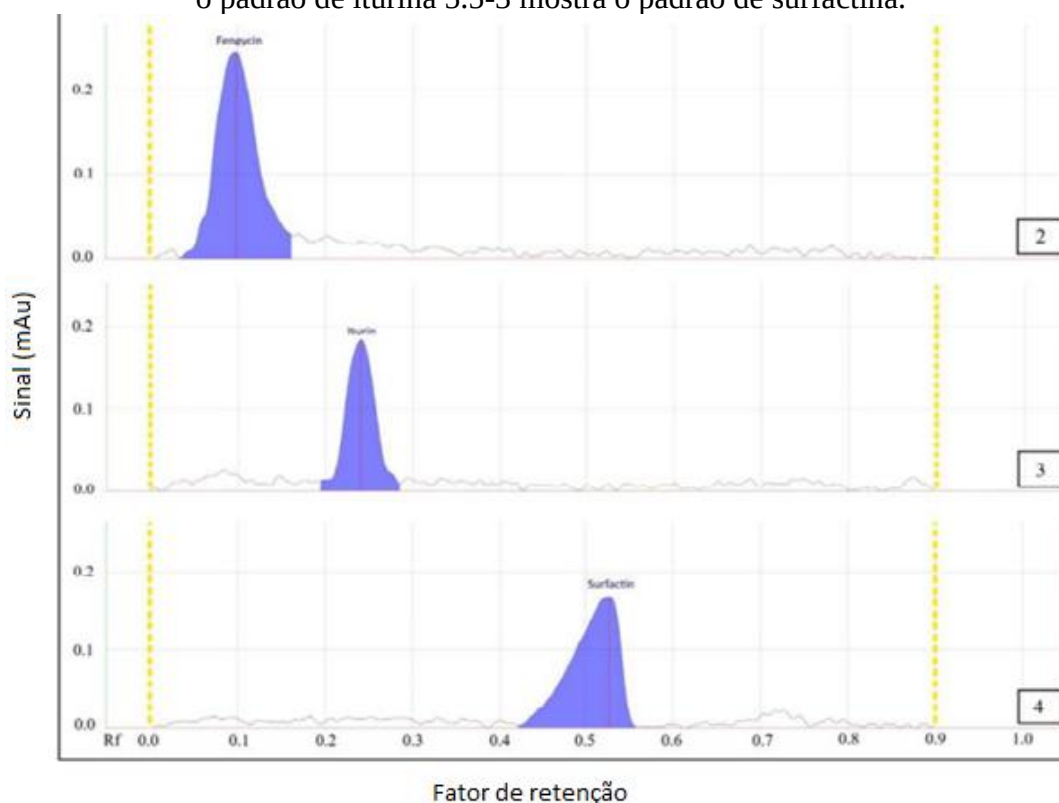
De acordo com os cromatogramas obtidos por Ley-López et al. (2022) pode-se observar que os biossurfactantes produzidos podem ser outros lipopeptídeos como a fengicinas e a iturina. Na Figura 5.5 observa-se que o primeiro composto a eluir com menor tempo de retenção é a fengicina (Figura 5.5-1) e logo após a iturina (Figura 5.5-2). Tais informações comprovam que o processo de produção proposto foi capaz de produzir dois lipopeptídeos e uma pequena concentração de surfactina.

Pode-se considerar que o processo proposto tem capacidade de produção de três tipos de lipopeptídeos a surfactina, a iturina e a fengicina. Esse resultado é muito interessante pois infere que o processo proposto tem capacidade de produção de três lipopeptídeos e em grande concentração de iturina e fengicina. Tendo em vista que esses dois lipopeptídeos possuem diversas propriedades biológicas relatadas por diversos autores como: anticâncer, na qual verificou uma atividade antitumoral pela indução da atividade pró-apoptose, inibindo a invasão de células cancerígenas (KIM et al., 2007), antivírus (VOLLENBROICH et al., 1997), anti-inflamatório (GEN et al., 2016), antifúngico (TABBENE et al., 2011).

A iturina A possui sua capacidade antitumoral comprovada por estudos desenvolvidos por Dey et al. (2015), na qual eles confirmaram que a iturina A poderia induzir apoptose em células de câncer de pulmão. Enquanto as fengicinas possuem maiores propriedades antifúngicas, elas possuem capacidade de degradar a membrana plasmática de fungos (ABREU et al., 2022).

Os lipopeptídeos produzidos possuem diversas propriedades biológicas, que permite sua aplicação em indústrias farmacêuticas. Sendo interessante investigar mais sobre a presença desses lipopeptídeos e buscar formas de otimizar o processo a fim de aumentar a produção dos lipopeptídeos.

Figura 5.5 – Perfil de eluição padrão de lipopeptídeos. 5.5-1 padrão de Fengicina 5.5-2 mostra o padrão de iturina 5.5-3 mostra o padrão de surfactina.



Fonte: Adaptado de Ley-López et al. (2022)

5.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE *Bacillus safensis* 28

5.3.1 Análise da cinética de produção de biomassa e consumo de substrato

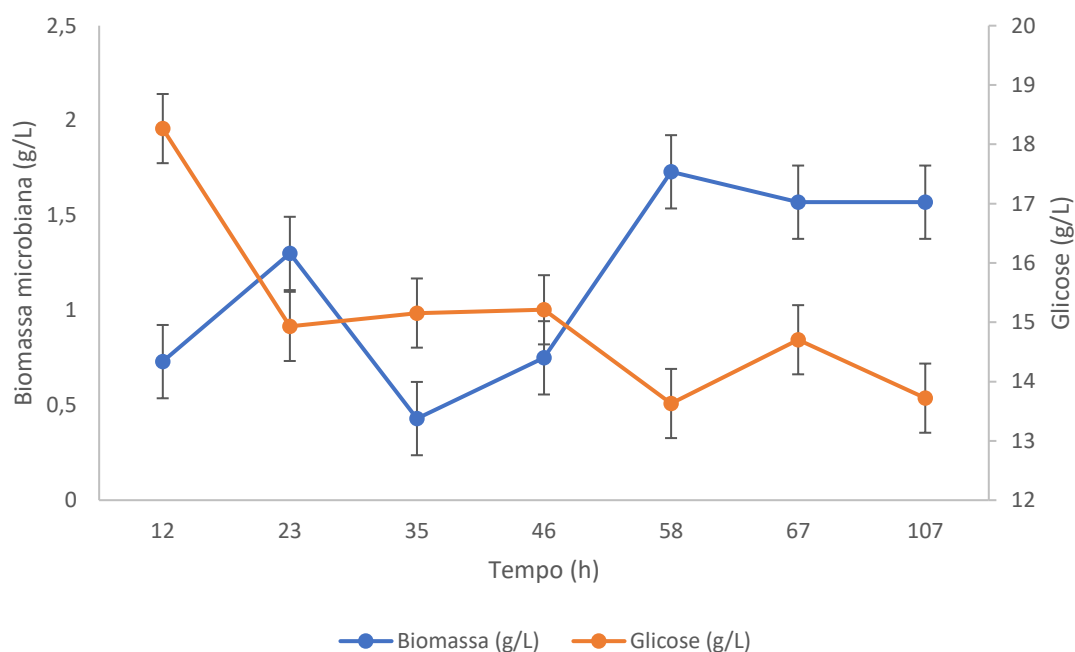
Realizou-se dois experimentos utilizando o *B. safensis* 28 nos quais pode-se avaliar o comportamento do microrganismo em relação ao consumo de substrato e a produção de biomassa. A Figura 5.6 representa a produção de biomassa em relação ao consumo de substrato da primeira produção (P1), sem suplementação de nitrogênio, e a Figura 5.7 representa a segunda produção (P2), com suplementação de nitrogênio.

Na primeira produção com *B. safensis* 28 (P1) houve interferência nos resultados devido à falta de energia no laboratório em 23h de cultivo, passando de 6 a 7 horas sem agitação, interrompendo o desenvolvimento da fase exponencial comprometendo o resultado. Observando um reinício da fase exponencial do processo em 35 horas de cultivo. Mesmo com a interferências no cultivo decidiu-se realizar uma suplementação sem repetir a produção porque o pré-inóculo desse processo teve duração bem superior a expectativa, de 6 a 8 horas.

Sendo necessários mais de 32 h de inoculo para que houvesse a concentração próxima da necessária para iniciar a produção, com concentração por densidade ótica de 0,435.

Como houve a interrupção na fase exponencial observou-se que a 23 h de cultivo a produção de biomassa começa a decair chegando a um valor próximo do início da produção. Logo após 35 h observa-se um aumento na concentração de células, indicando que o processo de replicação de células é reiniciado, obtendo-se um crescimento exponencial até 58 h de cultivo, mas por conta da baixa concentração de substrato há uma pequena produção, determinada após a recuperação desse biossurfactante.

Figura 5.6 – Cinética de produção por *Bacillus safensis* 28 em meio com extrato aquoso da algaroba (P1). Relacionando produção de biomassa e consumo de substrato em relação ao tempo de produção.

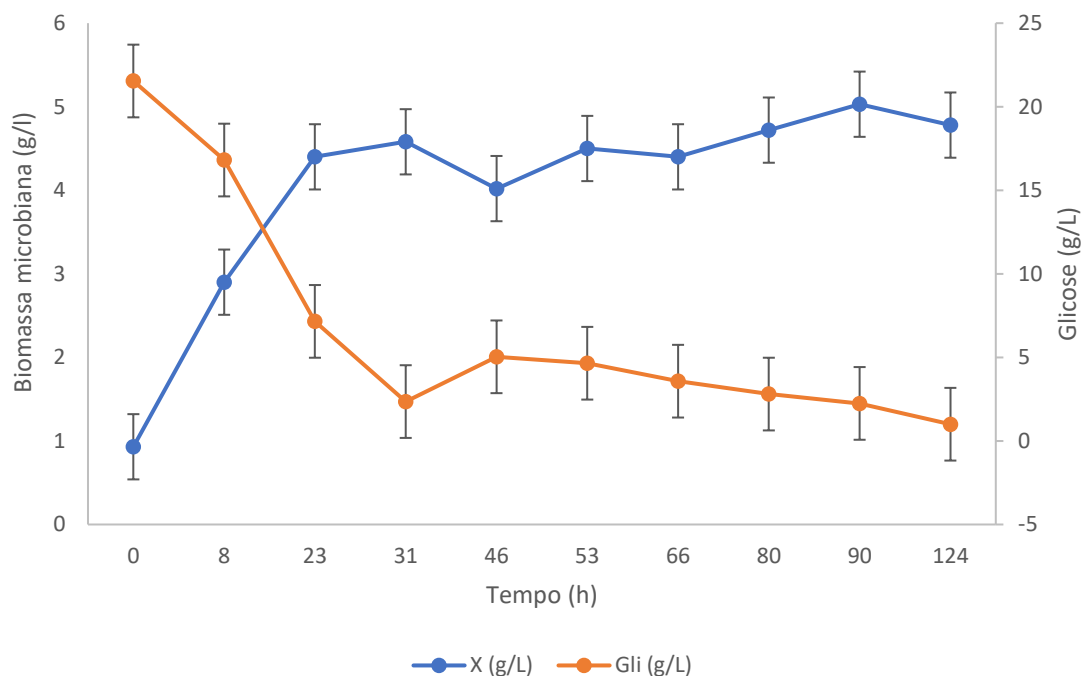


Para avaliar a produção foi considerado o início da produção às 35 h de processo. A partir dessa convenção, torna-se possível fazer uma avaliação dos dados da produção. Observa-se um aumento na concentração celular atingindo um valor máximo ($X_{\text{máx.}}$) a 58 horas de cultivo, devido as interferências, com concentração de $1,73 \pm 0,63$ g/L, fator de conversão de substrato em células na fase exponencial, Tabela 5.5, ($Y_{x/s}$) de $0,286$ g_x/g_s, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) é de $0,0607$ h⁻¹, produtividade em células P_X de $10,8$ mg/L.h e tempo de geração t_g de $11,42$ h. O consumo de substrato das 35 às 107 h de produção foi de $1,49$ g/L, porém, após todo o processo produtivo restou 75,12% do total de açúcares presentes inicialmente no meio nutritivo.

A baixa concentração final de biossurfactantes recuperado de 40,80 mg/L, acarretando em baixo fator de conversão de células em produto $Y_{P/X}$ de 0,031 g_p/g_x, fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ de 0,009 g_p/g_s e baixa produtividade em produto P_p 0,34 mg/L.h. Ocorreu pela falta de suplementação do meio, porque ao final da produção observado há a presença de elevada concentração de açúcares.

De acordo com a Figura 5.7 conclui-se que na produção (P2) tem-se um aumento na concentração celular atingindo um valor máximo ($X_{máx.}$) a 31 horas de cultivo com concentração de $4,58 \pm 0,3$ g/L, fator de conversão de substrato em células na fase exponencial ($Y_{x/s}$) de 0,178 g_x/g_s, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx.}$) é de $0,0469 \text{ h}^{-1}$, produtividade em células P_x de 30,4 mg/L.h e tempo de geração t_g de 14,78 h, Em relação ao consumo de substrato constatou-se que em 124 h o cultivo apresenta uma concentração de substrato de 1,0 g/L, de modo que se pode determinar que o consumo de substrato durante o cultivo foi de 20,54 g/L, praticamente todo o substrato foi convertido em bioproduto restando apenas 4,64% dos açúcares não consumidos.

Figura 5.7 – Cinética de crescimento do *Bacillus safensis* 28 em meio com algaroba e extrato de levedura. Relacionando produção de biomassa e consumo de substrato em relação ao tempo de produção.



Pode-se observar que em relação ao biossurfactante produzido, Tabela 5.5, obteve-se uma considerável produtividade em produto P_p de 1,08 mg/L.h, fator de conversão de células

em produto $Y_{P/X}$ de 0,036 g_p/g_x fator de conversão de substrato em produto $Y_{P/S}$ de 0,006 g_p/g_s e concentração final de biossurfactante produzido de 130,03 mg/L.

Aos comparar os dois cultivos do presente estudo utilizando o *B. safensis* 28, pode-se observar que no meio suplementado com nitrogênio (P2) obteve-se maior produção de biomassa. Tendo em vista que mesmo com a interferência na (P1) a tendência era de um baixo rendimento em biomassa, verificando a necessidade de suplementação.

Tabela 5.5 – Resultados dos parâmetros cinéticos em relação ao crescimento celular

	<i>B. safensis</i> 28 (P1)	<i>B. safensis</i> 28 (P2)	Unidade
$\mu_{x\text{máx}}$	0,0607	0,0469	h ⁻¹
$Y_{X/S}$	0,286	0,178	g _x /g _s
P_X	10,8	30,4	mg/L.h
t_g	11,42	14,78	h
$Y_{P/X}$	0,031	0,036	g _p /g _x
$Y_{P/S}$	0,009	0,006	g _p /g _s
P_P	0,34	1,08	mg/L.h
$[P]_{\text{recuperado}}$	40,80	130,03	mg/L

Legenda: $\mu_{x\text{máx}}$ – Velocidade específica máxima de crescimento; $Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em célula; P_X – Produtividade em células; t_g – Tempo de geração; $Y_{P/X}$ – Fator de conversão de células em produto; $Y_{P/S}$ – Fator de conversão de substrato em produto; P_P – Produtividade em produto; $[P]_{\text{recuperado}}$ – concentração de biossurfactante recuperado.

Devido aos poucos relatos na literatura sobre o emprego do *B. safensis* em processos de produção de biossurfactante os resultados obtidos com o *B. safensis* 28 serão comparados com produções utilizando outros microrganismos a fim de avaliar se a produção em questão possuiu um bom rendimento em biomassa.

Pode-se observar que Dias (2019) que utilizou *B. subtilis* UFPEDA 86 em um meio com 50% de extrato aquoso de algaroba. Teve como resultados a máxima concentração de células ($X_{\text{máx.}}$) 8,4 g/l foi obtida em 36 h de cultivo (Tabela 5.6). inferindo que a elevada concentração de açúcares utilizada não surtiu efeito tão significativo em crescimento celular. Enquanto Rocha (2017) desenvolveu um processo de cultivo com o melaço de cana como substrato e *B. subtilis* UFPEDA 438 seguindo as condições de agitação a 200 rpm e razão de aeração 0,4. Obtendo como resultado concentração máxima de células ($X_{\text{máx.}}$) de 1,42 g/L,

velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de 0,206 h⁻¹ e ao final da produção com substrato residual de 78%. Já Paiva (2023) também realizou produção com as mesmas condições utilizada por Rocha (2017) obtendo uma produtividade em bioproduto de 148,5 mg/L.

Tabela 5.6 – Comparativo de resultados cinéticos do presente estudo com a literatura.

	<i>B. safensis</i> 28		DIAS (2019)	ROCHA (2017)
	(P.1) 1% E.A.	(P.1) 1% E.A.	50% E. A.	4% M. C.
$X_{\text{máx.}}$	1,73 g/L	4,58 g/L	8,4g/L	1,42g/L
$Y_{X/S}$	0,286	0,178	—	—
$\mu_{\text{xmáx}}$	0,0607	0,0469	—	0,206
P_p	0,34 mg/L.h	1,08 mg/L.h	—	—

Legenda: $\mu_{\text{xmáx}}$ – Velocidade específica máxima de crescimento; $Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em célula; $X_{\text{máx}}$ – Concentração de células na fase exponencial; P_p – Produtividade em produto.

A proposta do presente estudo de avaliar o melhor meio de cultivo para crescimento celular de *B. safensis* 28 constatou que entre os dois meios elaborados a presença de suplementação de nitrogênio otimizou a capacidade de replicação celular, porém a concentração de extrato de levedura empregada possa ainda ser otimizada. No entanto foi comprovado que *B. safensis* 28 necessita de suplementação.

Os resultados obtidos nesse estudo utilizando o meio suplementado e *B. safensis* 28 mostram que em comparação com resultados obtidos por outros autores como Dias (2019), Rocha (2017) e Paiva (2023), a produção de biossurfactante foi considerável tendo em vista que a concentração final de biossurfactante produzido foi similar a encontrada por Paiva (2023) que utilizou o *B. subtilis* UFPEDA 438.

Em relação a concentração máxima de células na fase exponencial podemos observar que o presente estudo teve uma replicação de células muito expressiva tendo em vista a baixa concentração de açúcares se comparado com Dias (2019). A suplementação do meio para o cultivo do *B. safensis* 28 foi importante para promover melhor aproveitamento dos açúcares do meio resultando em maior taxa de produção de biomassa.

5.3.2 Análise da produção do biossurfactante por *Bacillus safensis* 28

O índice de emulsificação (IE₂₄) foi avaliado após as 24 h de repouso, a fim de determinar de forma indireta a presença de biossurfactante e a capacidade de emulsificação do caldo de cultivo livre de células.

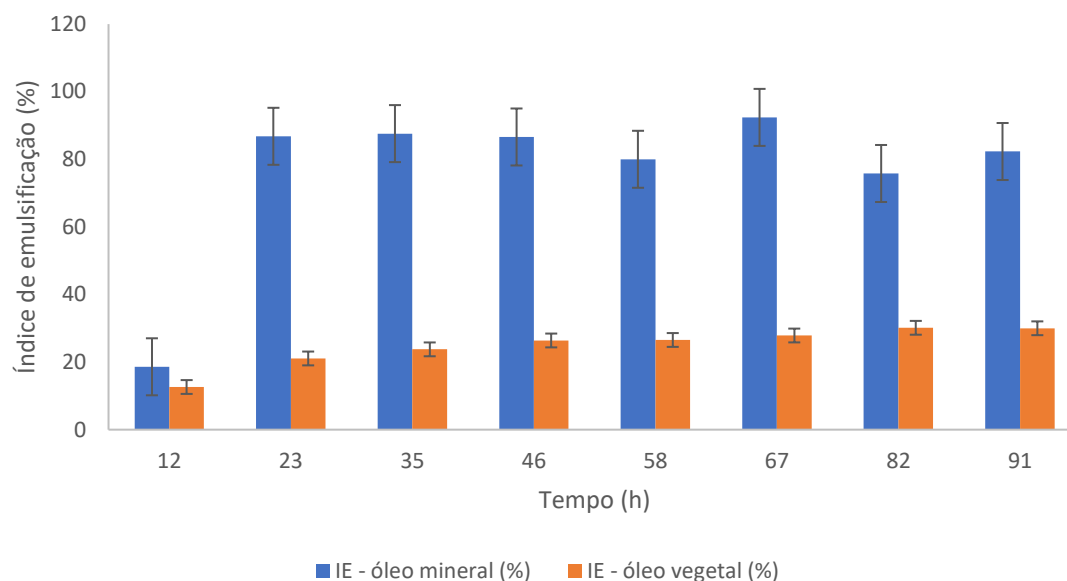
A partir dos resultados apresentados na Figura 5.8, que demonstra os valores percentuais para índice de emulsificação, pode-se inferir que na (P1) mesmo com a pouca produção de biomassa houve uma certa produção de biossurfactante. O mesmo possui maior afinidade com moléculas com maior peso molecular como e o caso do óleo lubrificante automotivo (mineral). Em contrapartida, a emulsificação em relação ao óleo vegetal foi bem menor.

Pode-se observar que em relação ao óleo mineral obteve-se valores de emulsificação variando de 18,6 % a 92,4%, constatando que houve um máximo de produção de biossurfactante com 67 h de produção. O índice de emulsificação do biossurfactante ao fim da produção demonstra que o biossurfactante produzido tem eficiência de emulsificação menor que a obtida com 67 h, mas uma boa emulsificação de 92,4%. Ao analisar os dados de produção de biomassa e o índice de emulsificação pode-se inferir que o processo de produção nessas condições da (P1) podem ser realizados até as 67 h de produção.

Em relação ao índice de emulsificação com o óleo vegetal, pode-se notar que a menor afinidade da molécula de biossurfactante ocasionou uma menor emulsificação da coluna biossurfactante/óleo obtendo valores de emulsificação em torno de 12,6% a 30%. Que quando comparado com a taxa de emulsificação para o óleo mineral verifica-se que o biossurfactante produzido tem características emulsionantes da surfactina.

Em relação à (P2), Figura 5.9, com *B. safensis* 28 pode-se observar que houve um rendimento menor na produção de biossurfactante resultando em menores taxas de emulsificação. A partir dos resultados de índice de emulsificação foi constatado que o biossurfactante obtido não possui uma excelente taxa de emulsificação quanto o obtido na (P1), constatando que com a adição de 1% do extrato de levedura a produção de outros metabólitos por *B. safensis* 28 foi favorecida ou até mesmo biossurfactantes com melhor capacidade de redução de tensão superficial, sendo necessário uma posterior análise desse parâmetro para confirmação. O índice de emulsificação para o óleo lubrificante manteve-se em torno de 55 % determinado que a produção foi aceitável.

Figura 5.8 – Índice de emulsificação para o cultivo por *Bacillus safensis* 28 (P1).

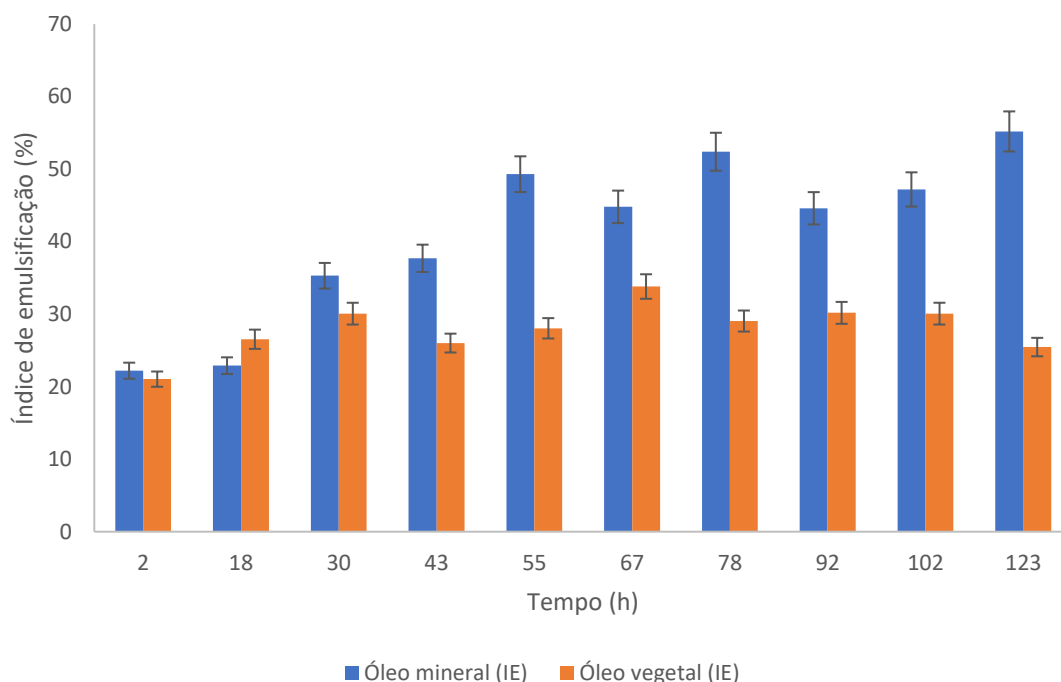


Outra forma de seria testar a produção em um meio com diferentes concentrações de extrato de levedura a fim de otimizar o processo e obter o melhor rendimento do biossurfactante produzido. Porque a concentração de nitrogênio no meio pode ter ficado elevada alterando a composição da molécula de biossurfactante. Que ao avaliar outros parâmetros pode inferir se essa baixa emulsificação ocasionou melhora em outras propriedades.

Segundo Lateef et al. (2015), o *B. safensis* é capaz de produzir diversas enzimas industriais com a amilase, celulase, protease, lipase, xilanase, quitinase, inulinase queratinase e γ -galactosidase. Devido essa gama de enzimas que podem ser sintetizadas por essa bactéria pode-se inferir que com a adição de 1% de extrato de levedura tais compostos foram favorecidos.

Em relação ao óleo vegetal o índice de emulsificação verificado na Figura 5.8 variou em torno de 21,4% a 30%. Nessa produção pode ser verificado um menor rendimento em produto.

Figura 5.9 – Índice de emulsificação para o cultivo por *Bacillus safensis* 28 (P2).



O biossurfactante produzido por *B. safensis* 28 possui uma alta capacidade emulsificante por ter índice de emulsificação de 92,4% em relação a mistura óleo lubrificante/biossurfactante.

Tabela 5.7 – Comparativo de resultados de emulsificação do presente estudo com a literatura.

	<i>B. safensis</i> 28	DIAS (2019)	FELIX (2012)	DAS (2019)
	(P.1) 1% E.A.	(P.2) 1% E. A. 1% E.L.	50% E. A.	4% M. C. 4% B. C.
Óleo mineral	92,4%	55%	83,01%	—
Óleo vegetal	30%	30%	61,21%	—
Óleo diesel	—	—	—	67,5% 68,66%

Legenda: E.A. – Extrato aquoso da algaroba; M.C. – Melão de cana de açúcar; E.L. – Extrato de levedura; B.C. – Bagaço de cana.

Ao comparar os resultados obtidos nas duas condições de cultivo com resultados obtidos por outros autores, Tabela 5.7, podemos observar que na (P1) mesmo com o baixo crescimento celular houve a produção de um biossurfactante com elevada capacidade de emulsificação em comparação com a obtida por Dias (2019), Felix (2012) e Das (2019).

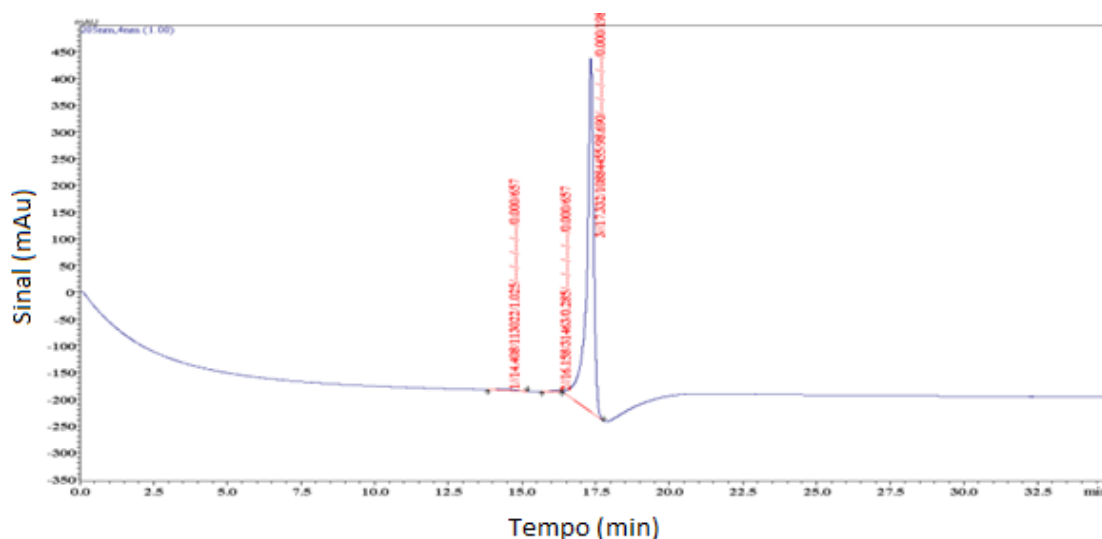
No entanto o biossurfactante produzido por Das e Kumar (2019), a partir da linhagem *B. safensis* J2, com bagaço de cana-de-açúcar, na concentração de 4% como meio nutritivo, obteve como índice de emulsificação no óleo diesel 68,66% em 72 horas de cultivo.

5.3.3 Processos de purificação de biossurfactante por *Bacillus safensis* 28

5.3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram realizadas para identificar os compostos presentes no bioproduto obtido pelos dois cultivos utilizando *B. safensis* 28. Como a surfactina é o biossurfactante de maior interesse devido suas propriedades, buscou-se analisar primeiramente o padrão surfactina, a fim de obter um cromatograma padrão para identificação desse lipopeptídeo (Figura 5.10). Segundo Lateef et al. (2015), *B. safensis* possui a capacidade de sintetizar diversos compostos, incluindo biossurfactantes.

Figura 5.10 – Perfil de eluição do padrão surfactina (Sigma-Aldrich)

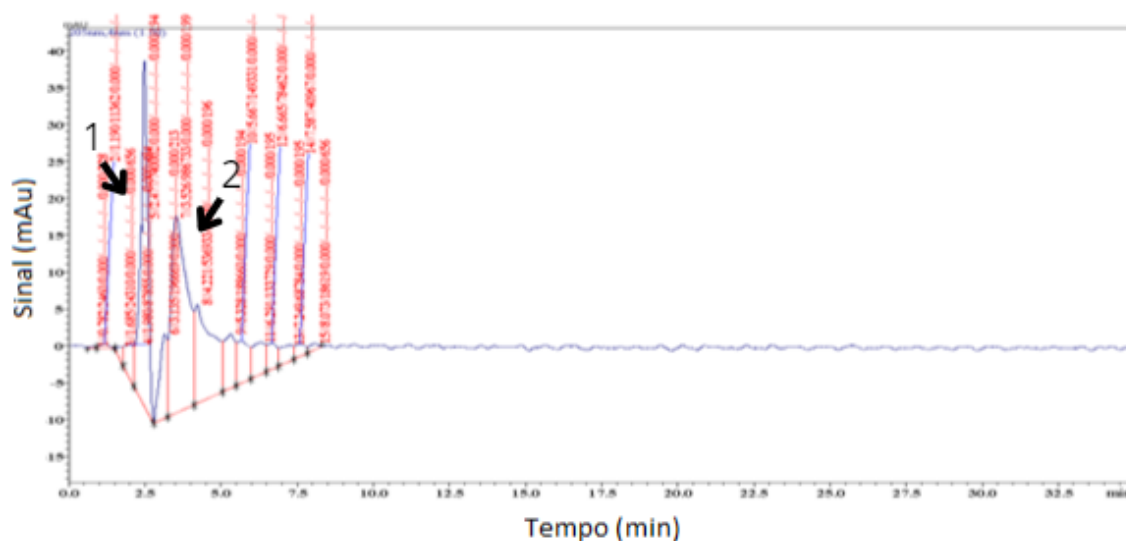


O cromatograma da surfactina padrão (Figura 5.10) mostra que seu tempo de retenção é de aproximadamente 16,5 – 17,5 min, permitindo assim a comparação com os cromatogramas da amostra de bioproduto.

No cromatograma disposto na Figura 5.11, obtido pela eluição do bioproduto, observa-se que na amostra avaliada referente a (P1) por *B. safensis* 28 foi detectado a presença de uma variedade de compostos com tempo de retenção muito próximos não

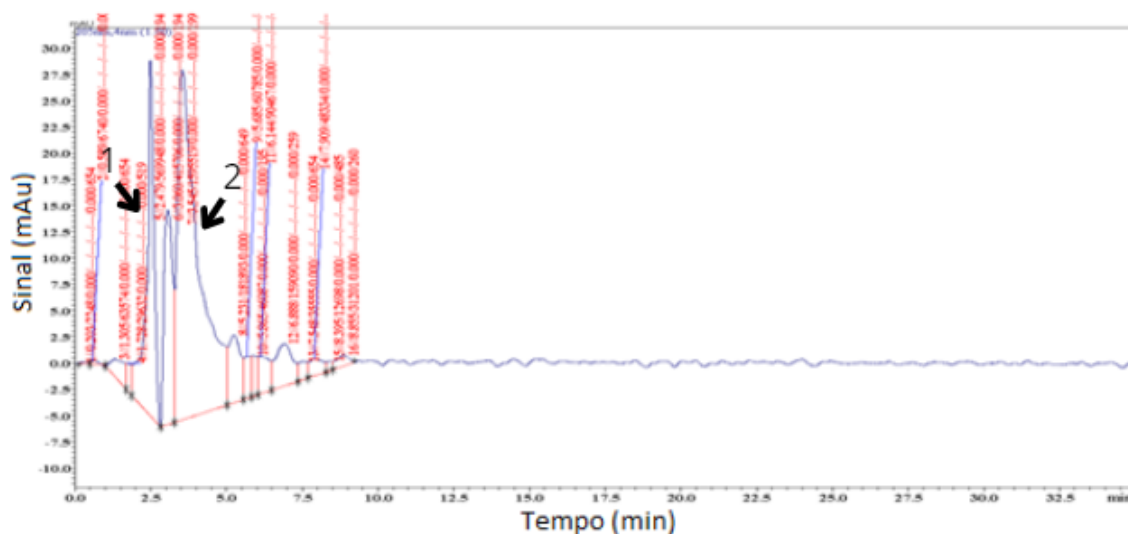
permitindo uma boa separação dos compostos presentes, tal fato pode ter ocorrido pela baixa concentração do biossurfactante produzido e possível presença de impurezas. Mas é possível determinar que a maior concentração de bioproduto encontra-se entre 2,5 a 5 min, enquanto que outros compostos com concentrações menores foram detectados em tempos de retenção bem próximo ao composto de maior concentração.

Figura 5.11 – Perfil de eluição do bioproduto obtido por *Bacillus safensis* 28 (P1)



No cromatograma da Figura 5.12, obtido pela eluição do bioproduto, observa-se que na amostra avaliada referente a (P2) por *B. safensis* 28, observa-se comportamento bem similar ao cromatograma anterior, mas com um pico maior o que infere uma maior concentração de biossurfactante produzido, comprovando a maior eficiência do processo de cultivo já evidenciada no tópico 5.3.1. Não foi possível uma boa separação dos compostos, porém foi detectado uma grande concentração nos picos sinalizados como 1 e 2 com tempo de retenção entre 2,5 a 5 min.

Figura 5.12 – Perfil de eluição do bioproduto obtido por *Bacillus safensis* 28 (P2)



Ao comparar os cromatogramas obtidos com o padrão de surfactina foi possível constatar que no mesmo tempo de retenção do padrão de surfactina não foi identificada presença de compostos, que infere que o microrganismo produziu alguma isoforma da surfactina ou até outros compostos.

Ao comparar os resultados obtidos com os cromatogramas obtidos por Ley-López et al. (2022) pode-se observar que os biosurfactantes produzidos podem ser fengicinas e iturina. De acordo com a Figura 5.5 o primeiro composto a eluir é a fengicinas (Figura 5.5-1) e logo após a iturina (Figura 5.5-2). Esse cromatograma possibilita afirmar que a produção dessas isoformas foi favorecida. Porém análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) foram realizadas para confirmar essa hipótese.

A presença de fengicina e iturina na amostra de biosurfactante produzida é bastante animadora, porque esses lipopeptídeos possuem diversas propriedades biológicas que permite aplicação em indústrias farmacêuticas conferindo grande importância na otimização do processo para escala industrial.

5.3.4 Caracterização de biossurfactante por *Bacillus safensis* 28

5.3.4.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) com refletância total atenuada (ATR).

O espectro de infravermelho do biossurfactante produzido por *B. safensis* 28 (Figura 5.13) quando comparado com os espectros obtidos por Janek et al., (2021) (Figura 5.14), para a surfactina comercial e o biossurfactante obtido por *B. subtilis* #309, pode-se observar que ambos os espectros apresentam bandas correspondentes ao componente peptídico em 3300–3400 cm^{-1} , deformação axial de ligação N-H. Em 2840-3000 cm^{-1} corresponde a presença de cadeia alifática com a ligação C-H. A banda observada em 1735-1750 cm^{-1} corresponde a um grupo carbonila, em 1650-1700 cm^{-1} ligação CO-N, enquanto a absorção a 1620-1660 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O da amida I. em 1520-1550 cm^{-1} tem a ligação N-H.

Algumas pequenas diferenças entre os espectros podem ser ocasionadas por impurezas na amostra. Contudo, as semelhanças encontradas entre os três espectros confirmam que o biossurfactante produzido por *B. safensis* 28 é de fato surfactina. Porque possui todos os grupos funcionais da surfactina padrão e da surfactina produzida por *B. subtilis* #309. Todos os grupos funcionais são semelhantes conferindo as mesmas propriedades para o bioproduto produzido.

O espectro de FTIR da Figura 5.13 é semelhante ao encontrado por Rocha (2007), Felix (2012), Oliveira et al. (2013), Marim (2014), Cruz (2017), Das e Kumar (2019),

Figura 5.13 – Espectro Infravermelho do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* 28

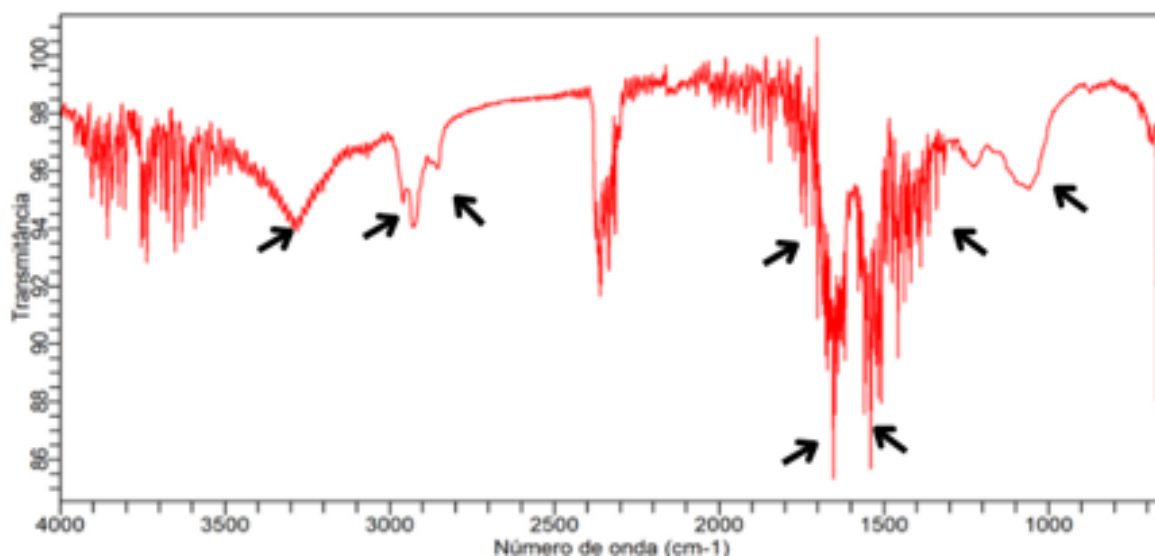
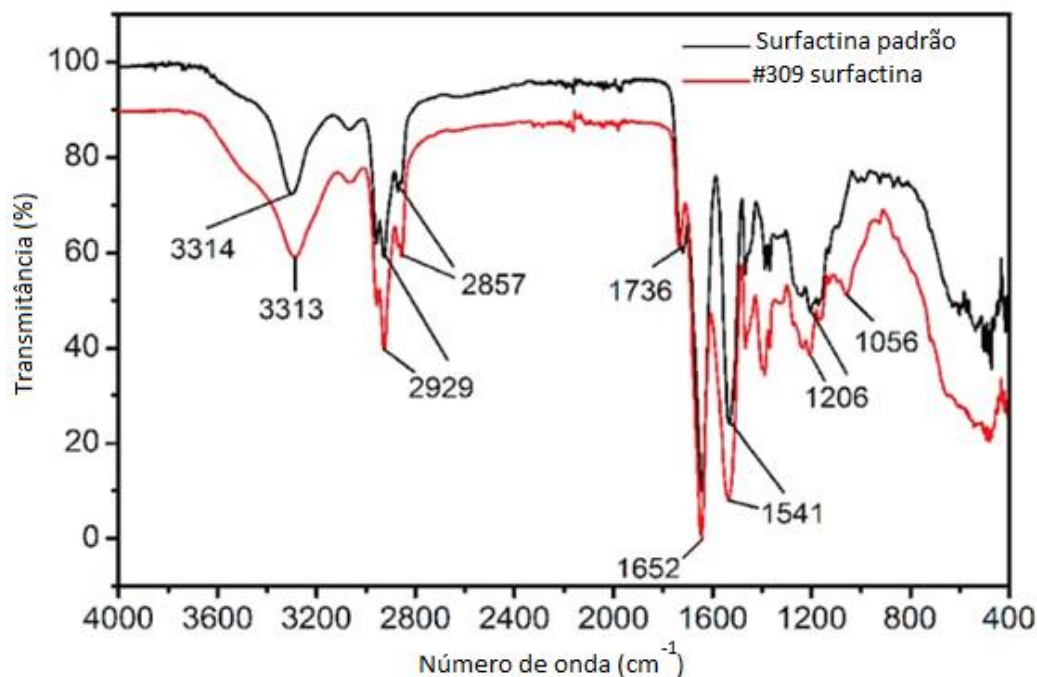


Figura 5.14 – Espectro Infravermelho do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* #309 e surfactina padrão



Fonte: JANEK et al. (2021)

A partir do desenvolvimento dessa pesquisa e com os resultados obtidos pode-se considerar que é um estudo bastante promissor onde foi possível propor estratégias de produção de biossurfactantes utilizando duas bactérias *B. subtilis* UFPEDA 16 e *B. safensis* 28, utilizando um meio composto por extrato aquoso das vagens de algaroba.

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que para *B. subtilis* UFPEDA 16 o meio nutritivo proposto foi capaz de promover um certo crescimento celular e consequentemente uma boa produção de biossurfactante, mas para pesquisas futuras seria interessante avaliar o comportamento em relação a suplementação do meio e avaliar outra concentração de meio com menor concentração de açúcares. Contudo foi observado que o processo foi capaz de produzir lipopeptídeos com ótima capacidade de emulsificação em óleos de cadeia longa.

A estratégia empregada para cultivo com o *B. safensis* 28 em meio contendo suplementação de nitrogênio foi capaz de produzir biossurfactante e a partir da caracterização foi comprovada a presença da surfactina demonstrando-se um processo eficaz para o que foi proposto, podendo ser aplicado em indústrias farmacêuticas e de cosméticos

Em posteriores estudos cabe avaliar a concentração de extrato de levedura utilizada que pode estar elevada e ter interferido na estrutura do biossurfactante produzido, causando redução em sua capacidade de emulsificação. além de avaliar a capacidade de redução de tensão superficial para determinar se a alteração estrutural conferiu maior capacidade de emulsificação.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados cinéticos obtidos conclui-se que o cultivo com *B. subtilis* UFPEDA 16 utilizando o extrato aquoso de algaroba como fonte nutritiva foi bastante promissor na produção de biossurfactante.

Enquanto o cultivo com *B. safensis* 28 dentre as duas estratégias de cultivo o meio suplementado se destacou obtendo uma melhor resposta tendo um melhor aproveitamento pelo microrganismo.

Os biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* UFPEDA 16 e *B. safensis* 28 obtiveram boa emulsificação em óleo de cadeia carbônica longa em relação ao óleo com cadeia curta a capacidade de emulsificação foi muito baixa.

As técnicas de precipitação ácida seguida por extração líquido-líquido mostraram-se eficientes na recuperação dos bioprodutos, obtendo uma boa concentração de bioproducto após os processos.

O biossurfactante produzido por *B. subtilis* UFPEDA 16 e *B. safensis* 28 apresentaram a presença dos lipopeptídeos fengicina, iturina e surfactina.

O *B. safensis* 28 produziu a partir do seu meio de cultivo com extrato aquoso da algaroba suplementado a surfactina.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. P. S.; BERBERT, P. A.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZZO, A. P. Alternativa sustentável de uso da *Bacillus Amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatógenos: uma revisão. **Revista de Ciências Ambientais**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-15, 2 maio 2022. Centro Universitário La Salle - UNILASALLE. <http://dx.doi.org/10.18316/rca.v16i1.8339>.
- 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. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S.L.], v. 81, p. 141-146, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.006>.
- ALVES, A. C. M.; SANTOS, J. C. M.; SILVA, J. N. Estudo do Monitoramento das Aplicações Tecnológicas da *Prosopis Juliflora* (Algaroba). **Cadernos de Prospecção**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 374, 28 fev. 2022. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v12i2.27282>.
- ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422013000600019>.
- ARAUJO, L. L. G. C.; SODRÉ, L. G. P.; BRASIL, L. R.; DOMINGOS, D. F.; OLIVEIRA, V. M.; CRUZ, G. F. Microbial enhanced oil recovery using a biosurfactant produced by *Bacillus safensis* isolated from mangrove microbiota - Part I biosurfactant characterization and oil displacement test. **Journal Of Petroleum Science And Engineering**, [S.L.], v. 180, p. 950-957, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2019.06.031>.
- BARCELOS, G. S.; DIAS, L. C.; FERNANDES, P. L.; FERNANDES, R.; BORGES, A. C.; KALKS, K. H.; TÓTOLA, M. R. Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage. **Springerplus**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 49, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-49>.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades Químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 409-414, 19 jan. 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/94XRhjCmzpzvyfmqZTQTVLr/?lang=pt>. Acesso em: 11 jun. 2021.
- BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. **Holos**, [S.L.], v. 1, p. 15-28, 5 mar. 2012. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN). <http://dx.doi.org/10.15628/holos.2012.838>.
- BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, O Programa de Pós-Graduação Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: Estudos de produção e caracterização**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CRUZ, J. M. **Produção de biossurfactantes a partir de glicerol para aplicação durante a biodegradação de misturas biodiesel/diesel em solo**. 2017. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológica, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017.

DAS, A. J. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. **Environmental Technology & Innovation**. [S.L.], p. 100-110. nov. 2019.

DAS, A. J.; KUMAR, R. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. **Environmental Technology & Innovation**, [S.L.], v. 16, p. 100450, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eti.2019.100450>.

DIAS, C. H. A. **Estudo da estabilidade emulsificante do biossurfactante produzido a partir da linhagem *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) utilizando o extrato aquoso da algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw) DC] como substrato**. 2019. 59 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

DIAS, E. C. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa utilizando extrato aquoso da algaroba [*Prosopis Juliflora* (Sw) DC] como substrato**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

DIAS, E. C.; ANDRADE, A. S. A.; SILVA, A. L.; DIAS, C. H. A.; SOUSA, A. C. B.; ALMEIDA, A. F. Utilização do extrato aquoso da algaroba na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Revista saúde & ciência online**, v. 7, p. 397-412, 2018

DOBLER, L.; BRED, G. C.; ROCHA, P. M.; PAIVA, W. K. V.; SANTOS, E. S.; OLIVEIRA, R. R. Surfactin and surfactin-like production, purification, and application at marine environments. **ChemRxiv**, [S.L.], version 2. Cambridge University. <http://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv-2022-0x7vd-v2>

FELIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; ALMEIDA, J. G. L.; GIRO, M. E. A.; CAVALCANTE, K. F.; MELO, V. M. M.; PESSOA, O. D. L.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B.; AGUIAR, R. S. S. 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**, [S.L.], v. 175, p. 256-263, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>.

FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju**. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FREIRE, A. A.; SIMONELLI, G.; ASSIS, D. J.; DRUZIAN, J. I.; LOBATO, A. K. C. L. Surfactin production using papaya peel aqueous extract as substrate and its application for iron adsorption. **Research, Society and Development**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 437974077, 21 maio 2020. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4077>.

HIGGINS, F.; REIN, A. **Improved Measurement of Liquid Samples Using FTIR**. Danbury, Connecticut: Agilent Technologies, Inc, 2021. 6 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p.181-182.

JANEK, T. Z.; GUDIÑA, E. J.; POŁOMSKA, X.; BINIARZ, P.; JAMA, D.; RODRIGUES, L. R.; RYMOWICZ, W.; LAZAR, Z. Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 12, p. 3488, 8 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26123488>.

JIANG, J.; ZHANG, H.; ZHANG, C.; HAN, M.; DU, J.; YANG, X.; LI, W. Production, Purification and Characterization of 'Iturin A-2' a Lipopeptide with Antitumor Activity from Chinese Sauerkraut Bacterium *Bacillus velezensis* T701. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 2135-2147, 24 jun. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10989-021-10241-9>.

LARINI, M. M.; REZENDE, M. I.; RIBEIRO, M. L. L.; GASPARIN, F. G. M. Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, [S.L.], v. 17, n. 2, p. 105-118, 19 dez. 2017. Universidade do Oeste de Santa Catarina. <http://dx.doi.org/10.18593/eba.v17i2.15220>.

LATEEF, A.; ADELERE, I. A.; GUEGUIM-KANA, E. B. The biology and potential biotechnological applications of *Bacillus safensis*. **Biologia**, [S.L.], v. 70, n. 4, p. 411-419, abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1515/biolog-2015-0062>.

LEY-LÓPEZ, N.; HEREDIA, J. B.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, C. S.; IBARRA-RODRÍGUEZ, J. R.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; GARCÍA-ESTRADA, R. S. Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. **Revista Argentina de Microbiología**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 181-191, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2022.03.002>.

MAIA NETO, A. M. **Resíduos agroindustriais aplicados à produção de biossurfactantes: uma revisão**. 2021. 57 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

MANO, M. C. R. **Estudo da recuperação, concentração e purificação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MARIM, M. G. **Obtenção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC (9372) a partir de melaço de cana-de-açúcar**. 2014. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

MARKETS & MARKETS. **Biosurfactants Market by Type (Glycolipids, Lipopeptide), Application (Detergent, Personal care, Food processing, Agricultural chemicals) and Region (North America, Europe, Asia Pacific, Rest of the World) - Global Forecast to 2027**. 2022. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactant-market-163644922.html>. Acesso em: 06 set. 2023.

MARKETS & MARKETS. **Surfactants Market by Type (Anionic, Non-ionic, Cationic & Amphoteric), Application (Home Care, Personal Care, Industrial & Institutional Cleaning, Textile, Elastomers & Plastics, Agrochemicals, and Food & Beverage), and Region - Global Forecast to 2028**. 2023. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactants-market-493.html>. Acesso em: 06 set. 2023.

MAROLDI, W. V. **Otimização e avaliação multivariada na obtenção, purificação e caracterização de biossurfactante obtido por biorreação do *Bacillus subtilis* ATCC 9372 utilizando melaço de cana-de-açúcar**. 2018. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2018.

OLIVEIRA, D. W. F. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

RIBASKI, J.; DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R.; NASCIMENTO, C. E. S. **Algaroba (*Prosopis juliflora*): Árvore de Uso Múltiplo para a Região Semiárida Brasileira**. 240. ed. Colombo: Embrapa, 2009. 8 p.

ROCHA, P. M. **Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melaço de cana como substrato**. 2017. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

ROVINA, F.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Scientia Plena**, Campinas, v. 14, n. 4, p. 1-8, 18 maio 2018. Associação Sergipana de Ciência. <http://dx.doi.org/10.14808/sci.plena.2018.044201>.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 2001. 560 p. 2 v.

SECATO, J.; COELHO, D.; ROSA, N.; LIMA, L.; TAMBOURGI, E. B. Biosurfactant production using *bacillus subtilis* and industrial waste as substrate. **Chemical Engineering Transactions**, [S.L.], v. 49, p. 103-108, abr. 2016. AIDIC: Italian Association of Chemical Engineering. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1649018>.

SELVAM, K.; SENTHILKUMAR, B.; SELVANKUMAR, T. Optimization of low-cost biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* SASCBT01 and their environmental remediation potential. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 72, n. 1, p. 74-81, 13 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13394>.

SILVA, V. D. **Avaliação do Ciclo de Vida do processo de fermentação para produção de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato**. 2023. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

VARGAS, J. C.; SOUZA, L. A. F.; GOMES, A. C. C.; FERREIRA, M. J. P.; RIBAS, C.; PINTO, E. P.; BRAVO, C. E. C. Produção de biossurfactante em cultivo submerso de *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Development**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 2618-2636, 11 jan. 2023. South Florida Publishing LLC. <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv9n1-181>.

TAISMA, M. A. Usos medicinales de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. en comunidades rurales de la península de Paraguaná, Venezuela. **Revista Peruana de Biología**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 79-86, 21 abr. 2017. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Vicerectorado de Investigacion. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i1.13105>.

YANG, Z.; ZU, Y.; ZHU, J.; JIN, M.; CUI, T.; LONG, X. Application of biosurfactant surfactin as a pH-switchable biodemulsifier for efficient oil recovery from waste crude oil. **Chemosphere**, [S.L.], v. 240, p. 124946, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124946>.

ZHENG, J.; GONG, Z.; YIN, S.; WANG, W.; WANG, M.; LIN, P.; ZHOU, H.; YANG, Y. Rapid determination of lambda-cyhalothrin residues on Chinese cabbage based on MIR spectroscopy and a Gustafson–Kessel noise clustering algorithm. **The Royal Society of Chemistry**, Xangai, n. 2, p. 18457-18465, dez. 2022.