

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

CAMILA CRISTINA XAVIER BAPTISTA

**CRESCIMENTO DO *Bacillus pumilus* EM MEIOS DIVERSOS PARA
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES**

JOÃO PESSOA – PB

2024

CAMILA CRISTINA XAVIER BAPTISTA

**CRESCIMENTO DO *Bacillus pumilus* EM MEIOS DIVERSOS PARA PRODUÇÃO
DE BIODERIVADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação de Engenharia Química do Centro de
Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em
cumprimento aos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Química.

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

JOÃO PESSOA – PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B222c Baptista, Camila Cristina Xavier.

CRESCIMENTO DO *Bacillus pumilus* EM MEIOS DIVERSOS
PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES / Camila Cristina
Xavier Baptista. - João Pessoa, 2024.

41 f. : il.

Orientação: Sharline Santos.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Biossurfactante. 2. *Bacillus pumilus*. 3. caldo de
cana-de-açúcar. 4. melão. I. Santos, Sharline. II.
Título.

UFPB/BSCT

CDU 66.01(043.1)

CAMILA CRISTINA XAVIER BAPTISTA

**CRESCIMENTO DO *Bacillus pumilus* EM MEIOS DIVERSOS PARA PRODUÇÃO
DE BIOSSURFACTANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação de Engenharia Química do Centro de
Tecnologias da Universidade Federal da Paraíba
em cumprimento aos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 09 de outubro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **SHARLINE FLORENTINO DE MELO SANTOS**
Data: 17/10/2024 16:26:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – Orientadora
DEQ / CT / UFPB

Documento assinado digitalmente
 **ANDREA LOPES DE OLIVEIRA FERREIRA**
Data: 20/10/2024 12:46:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira – Examinadora
DEQ / CT / UFPB

Documento assinado digitalmente
 **RONALD HENRIQUE RODRIGUES DELFINO DA SILVA**
Data: 17/10/2024 16:29:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eng. Ronald Henrique Rodrigues Delfino da Silva – Examinador
PPGEQ / CT / UFPB

Aos meus pais, por todo carinho e educação que
me deram durante toda a minha vida.

Com muito amor e gratidão.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida. Ele que sempre me guiou e me sustentou em todos os momentos, me dando saúde e força para superar todas as dificuldades.

Aos meus pais, por sempre se fazerem presentes, não só com o apoio financeiro, mas com amor, palavras de incentivo, atenção e carinho. Obrigada por nunca medirem esforços para me proporcionar sempre o melhor que poderiam ofertar. Tudo que sou hoje é graças a vocês.

A todos os meus amigos que sempre me ajudaram e me deram forças. Em especial Bibia e Malu, que foram companheiras de escola, e mesmo com o surgimento das responsabilidades da vida adulta, nunca deixaram de se fazer presentes.

Aos professores e colegas do curso de Engenharia Química, pelos momentos compartilhados ao longo da graduação, que tornaram a minha formação acadêmica melhor.

A professora Sharline, minha orientadora, que é um grande exemplo de profissional. Seu incentivo, paciência e sabedoria foram fundamentais para que eu concluísse este trabalho. Obrigada por toda a dedicação, por acreditar em mim e por me guiar com tanto carinho.

A todos que fazem parte do Labio, pelos momentos compartilhados nesse laboratório. Fui muito feliz e sou muito grata por todo o aprendizado.

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

Por fim, a todos os familiares e amigos que me deram força e palavras de motivação para que eu não desistisse dos meus objetivos.

A persistência é o caminho do êxito

Charles Chaplin

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas produzidas por microrganismos que possuem estrutura semelhante aos surfactantes de origem química. Possuem a capacidade de formar agregados globulares ou micelas, possibilitando a redução da tensão superficial e a mistura de fases com polaridades distintas. Apresentam funções emulsionantes, podendo ser aplicados em diversas áreas da indústria, tais como as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, bem como na biorremediação de solos e mares contaminados. Oferecem vantagens em relação aos surfactantes sintéticos por poderem ser produzidos a partir de substratos renováveis, além da baixa toxicidade e melhor desempenho em variações de parâmetros como temperatura e pH. A produção industrial e comercialização em grande escala dos biossurfactantes é desfavorecida pelo seu alto custo de produção, sendo os substratos os maiores responsáveis por esse valor elevado. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo a produção de biossurfactantes em diferentes meios de cultivo contendo substratos de origem regional, para o crescimento da bactéria *Bacillus pumilus*, comparando-os com um meio comercial. Para todos os experimentos foram realizados os ensaios cinéticos da cepa do microrganismo. Na cinética de crescimento pode-se observar que o meio contendo melão foi o que mais favoreceu o crescimento de células, quando comparado aos outros dois. Na análise de produção de biossurfactante, o meio com melão também favoreceu uma maior produção da molécula, apresentando um percentual de emulsificação de 58,09% em 36 h de cultivo. O meio composto por caldo de cana não mostrou o crescimento microbiano esperado e apresentou baixa produção de biossurfactante, com índice de emulsificação de 45,99% em 24 h de cultivo.

Palavras-chaves: Biossurfactante; *Bacillus pumilus*; caldo de cana-de-açúcar; melão.

ABSTRACT

Biosurfactants are molecules produced by microorganisms that have a structure similar to surfactants of chemical origin. They have the ability to form globular aggregates or micelles, allowing the reduction of surface tension and the mixing of phases with distinct polarities. They exhibit emulsifying functions, making them applicable in several industrial sectors, such as the pharmaceutical, cosmetic, and food industries, as well as in the bioremediation of contaminated soils and seas. They offer advantages over synthetic surfactants, as they can be produced from renewable substrates, have low toxicity, and perform better under varying parameters such as temperature and pH. The industrial production and large-scale commercialization of biosurfactants is hindered by their high production cost, with the substrates being the main contributors to this high value. Therefore, the present study aimed to produce biosurfactants in different culture media containing substrates of regional origin, to support the growth of the bacterium *Bacillus pumilus*, comparing them with a commercial medium. Kinetic assays of the microorganism strain were carried out for all experiments. In the growth kinetics, it was observed that the medium containing molasses most favored cell growth when compared to the others. In the biosurfactant production analysis, the molasses medium also favored a higher production of the molecule, presenting an emulsification percentage of 58.09% after 36 hours of cultivation. The medium composed of sugarcane juice did not show the expected microbial growth and demonstrated low biosurfactant production, with an emulsification index of 45.99% after 24 hours of cultivation.

Keywords: Biosurfactant; *Bacillus pumilus*; sugarcane juice; molasses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de surfactante com grupos apolares e polares	15
Figura 2 - Esquema ilustrativo de um agente tensoativo e formação de micela.....	15
Figura 3 - Ilustração das regiões onde ocorrem formação de micelas (CMC).	16
Figura 4 - Estrutura química dos biossurfactantes mais estudados.	18
Figura 5 - Caldo e melão de cana-de-açúcar utilizados como substratos para composição dos meios de cultivo.....	25
Figura 6 - Microrganismo <i>B. pumilus</i> utilizado para o repique.	26
Figura 7 - Cinética de crescimento para o <i>Bacillus pumilus</i> nos meios com caldo de cana, com melão e meio comercial.	32
Figura 8 - Variação de pH nos meios com caldo de cana, com melão e meio comercial.	33
Figura 9 - Índice de emulsificação nos meios com caldo de cana e com melão.....	34
Figura 10 - Biossurfactante extraído do cultivo com caldo de cana.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Microrganismos produtores e aplicações de biossurfactantes	17
Tabela 3.2 – Principais classes e biossurfactantes e microrganismos produtores	20
Tabela 5.1 – Características físico-químicas do caldo e do melaço de cana-de-açúcar	31
Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos para <i>B. pumilus</i> nos meios com caldo nutriente, caldo de cana e melaço	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1 BIOSSURFACTANTES	15
3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES	19
3.2.1 <i>Bacillus pumilus</i>	21
3.3 UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS	22
3.3.1 Caldo de Cana-de-açúcar	22
3.3.2 Melaço de Cana-de-açúcar	23
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 SUBSTRATOS	25
4.2 MICRORGANISMO	26
4.3 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	26
4.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE	27
4.5 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO	29
4.6 SEPARAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO.....	31
5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE.....	31
6 CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são uma classe de moléculas anfipáticas de superfície ativa, ou seja, possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, que reduzem a tensão superficial na interface óleo-água, além de apresentar propriedades de formação de emulsões, assim permitindo a solubilidade de substâncias imiscíveis na água. Possuem um papel significativo e diverso em vários segmentos industriais (Santos, 2019; Singh; Patil; Rale, 2018). Os surfactantes são classificados em dois grupos: sintético e natural (Sharma; Kalita; Duarah, 2017).

Os surfactantes sintéticos, em sua maioria, têm origem em derivados do petróleo, assim sendo produzidos a baixo custo e em grande quantidade. No entanto, esta forma de produção não é nada sustentável. Além disso, os surfactantes químicos normalmente são tóxicos, possuem problemas de biocompatibilidade e causam danos ao ecossistema, limitando a sua aplicação (Sarubbo *et al.*, 2022).

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial utilizando o mesmo mecanismo dos surfactantes sintéticos (Fakruddin, 2012). Consistem em produtos metabólicos produzidos por diversos microrganismos principalmente para se adaptarem e crescerem nos mais variados substratos (Singh; Patil; Rale, 2018; Pinto; Martins; Costa, 2009).

Devido a ampla utilização de surfactantes pelos mais diversos setores industriais, e com as questões ambientais, os biossurfactantes têm sido alvo principal de estudos e desenvolvimento. Segundo Oliveira e Garcia-Cruz (2013) os biossurfactantes possuem maior aceitação e exibem uma série de vantagens quando comparado aos surfactantes químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, melhor compatibilidade com o meio ambiente, alta seletividade e eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

Embora sejam eficientes, os biossurfactantes comercializados atualmente possuem um alto custo de produção, comparado aos semelhantes sintéticos. Esse custo, porém, pode ser reduzido utilizando substratos alternativos, além de diferentes cepas microbianas produtoras de biossurfactantes (Sarubbo *et al.*, 2022).

Entre os microrganismos produtores de biossurfactantes, as bactérias do gênero *Bacillus* têm sido amplamente estudadas e demonstrado grande potencial industrial. O *Bacillus pumilus* é relatado como produtor de surfactantes do tipo lipoproteína da família das surfactinas. Este composto é extremamente interessante devido a sua alta atividade superficial e a possibilidade de aplicação em grandes setores industriais (Oliveira; Garcia-Cruz, 2013).

Na produção de biossurfactantes, os substratos utilizados influenciam diretamente no

rendimento, quantidade, qualidade e características físico-químicas do produto. Por isso, a escolha de uma fonte de carbono adequada, concentração de nutrientes e as condições de crescimento são de extrema importância para o processo (Oliveira, 2021).

Diante da crescente demanda por alternativas sustentáveis na produção de surfactantes e da necessidade de otimizar processos industriais, neste trabalho foram escolhidos o caldo de cana-de-açúcar e o melaço, como constituintes principais dos meios de cultivo, que são produtos agroindustriais obtidos através da moagem da cana e da fabricação do açúcar, respectivamente. Ambos possuem baixo custo, sendo amplamente utilizado em bioprocessos. Seus desempenhos foram, ainda, comparados com um meio comercial padrão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o crescimento e produção de biossurfactantes por cepas da bactéria *Bacillus pumilus* utilizando diferentes meios de cultivo: caldo nutriente, caldo de cana-de-açúcar e melação de cana-de-açúcar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

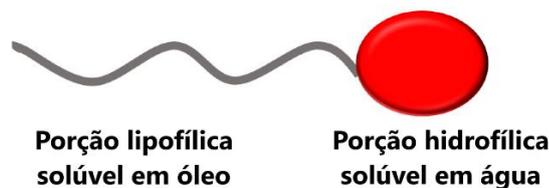
- Realizar a caracterização físico-química dos substratos caldo e melação de cana-de-açúcar;
- Avaliar diferentes substratos na composição de meios e a utilização do *Bacillus pumilus* para a produção de biossurfactantes;
- Estudo da cinética de crescimento celular e produção de biossurfactante;
- Realizar a separação do biossurfactante.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BIOSSURFACTANTES

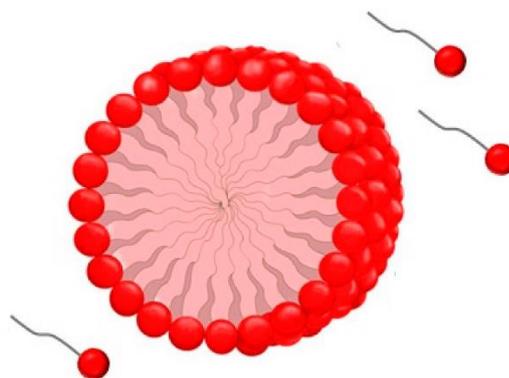
Os biossurfactantes são compostos tensoativos que podem ser produzidos por uma grande variedade de microrganismos, seja por bactérias, leveduras ou fungos. Tratam-se de moléculas anfipáticas que contêm grupos hidrofílicos (polar) e lipofílicos (apolar), como mostra a Figura 1, permitindo a formação de micelas, que são estruturas globulares, representadas na Figura 2, que se acumulam na interface de fluidos com polaridades distintas, como óleo e água. Com isso, os biossurfactantes são utilizados para reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos não miscíveis, atuando como agente emulsionante (Meira, 2022; Vale *et al.*, 2023).

Figura 1 - Molécula de surfactante com grupos apolares e polares



Fonte: Adaptado de Santos *et al.*, 2016.

Figura 2 - Esquema ilustrativo de um agente tensoativo e formação de micela.

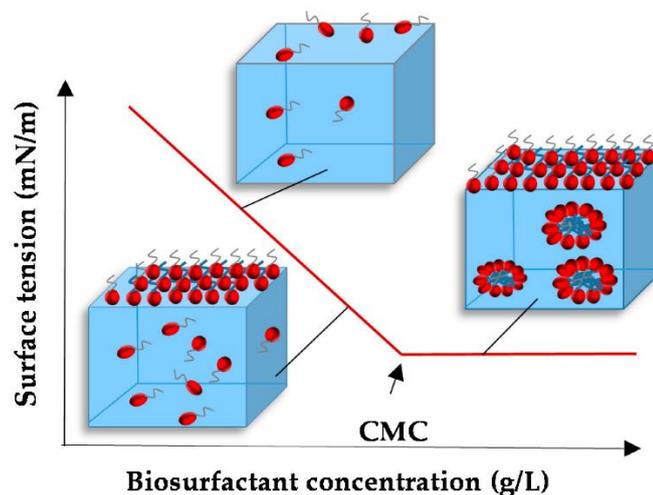


Fonte: Santos *et al.*, 2016.

A formação de micelas ocorre quando os surfactantes se agregam a uma concentração específica em uma solução. Essa concentração é chamada de concentração micelar crítica (CMC) e corresponde ao ponto em que o agente tensoativo reduz ao máximo a tensão

superficial (Karnwal *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2016). A Figura 3 esquematiza a formação de micelas e o alcance da CMC.

Figura 3 - Ilustração das regiões onde ocorrem formação de micelas (CMC).



Fonte: Santos *et al.*, 2016.

Por serem compostos naturais, os biossurfactantes oferecem vários benefícios em relação aos surfactantes sintéticos, como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, estabilidade térmica e de pH e ação antimicrobiana, sendo assim, ambientalmente seguros. São estáveis mesmo sob condições extremas e atuam em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade. Para os biossurfactantes serem produzidos, são necessários microrganismos que se desenvolvam em meios compostos por fontes de carbono, através de processos biotecnológicos. Por isso, dispõem de uma grande versatilidade em suas propriedades químicas devido à diversidade de estruturas. Por isso, podem apresentar diversas aplicações, como nas indústrias petrolífera, alimentícia, farmacêutica e cosmética, além da biorremediação (Oliveira Schmidt *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021; Vale *et al.*, 2023)

Os biossurfactantes podem ser classificados pela sua composição química (peso molecular baixo e alto) e depende da sua origem microbiana, como mostra a Tabela 1. Em geral, a porção hidrofílica é composta por aminoácidos, peptídeos, ânions ou cátions, mono, di ou polissacarídeos, e a parte lipofílica formada por ácidos graxos insaturados ou saturados. Os biossurfactantes de alto peso molecular, conhecidos por suas propriedades emulsificantes, consistem em lipoproteínas, polissacarídeos, entre outros, e os de baixo peso molecular, que

reduzem a tensão superficial com mais eficiência, são os glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos (Bueno, 2008; Nascimento *et al.*, 2024).

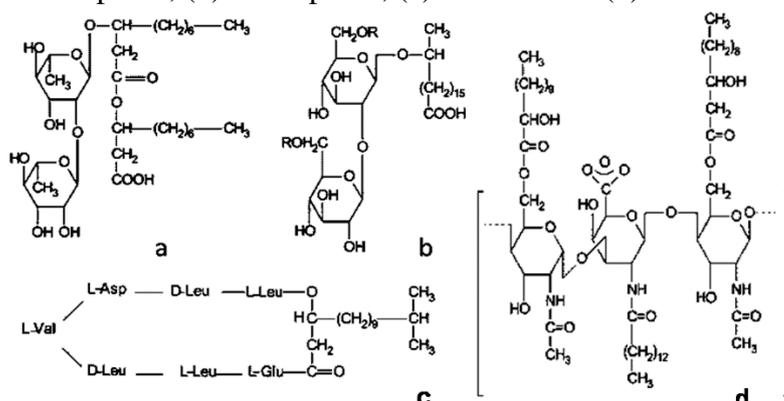
Tabela 3.1 - Microrganismos produtores e aplicações de biossurfactantes.

Tipos de biossurfactante	Microrganismos	Aplicação
<i>Biossurfactante de baixo peso molecular</i>		
Ramnolipídeo	<i>Marinobacter sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biorremediação
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Recuperação melhorada petróleo (MEOR) Alimentos Terapias de saúde
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i>	Cosméticos
Lichenisina	<i>Bacillus lichenformis</i>	MEOR Agricultura
<i>Biossurfactante de alto peso molecular</i>		
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	MEOR
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Biorremediação MEOR
Goma Xantana	<i>Xanthomonas campestris</i>	Alimentos Cosméticos

Fonte: Adaptado de Sharma, Lavania e Lal (2023) e Nitschke e Pastore (2002).

A maior parte dos setores industriais utilizam amplamente os surfactantes. Uma grande parte dos que estão disponíveis comercialmente deriva-se quimicamente do petróleo. Por tratar-se de uma fonte não renovável e com o aumento da preocupação ambiental, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, os biossurfactantes estão sendo amplamente procurados como uma alternativa aos produtos existentes (Barros; Quadros; Pastore, 2008; de Oliveira Schmidt *et al.*, 2021). A Figura 4 ilustra a estrutura química de alguns dos biossurfactantes mais estudados.

Figura 4 - Estrutura química dos biossurfactantes mais estudados. (a) Rhamnolipídeo; (b) Sorolipídeo; (c) Surfactina e (d) Emulsan.



Fonte: Santos *et al.*, 2016.

Segundo o Fortune Business Insights, o mercado global de biossurfactantes foi avaliado em cerca de USD 1,2 bilhão em 2022, crescendo aproximadamente 4 vezes, atingindo USD 4,41 bilhões em 2023 e com uma projeção de atingir USD 6,71 bilhões até 2032. A Europa é a região que mais utiliza esses produtos, tendo os produtos de limpeza como principal destino para esses compostos.

Em meados de 2020, a multinacional alemã BASF lançou no mercado asiático um produto à base de sorbitolipídeo, produzido por meio de fermentação, com propriedades antibióticas para uso em cosméticos para cuidados pessoais. Além disso, a empresa também realizou um acordo com uma *startup* do Reino Unido, afim de desenvolver ingredientes sustentáveis, derivados da fermentação, para aplicação em cosméticos, saneantes e outras formulações industriais. Em 2022, segundo a Mordor Intelligence, a Solvay lançou dois novos biossurfactantes de alto desempenho apropriados para uso em produtos de beleza como condicionadores, géis de banho, sabonetes faciais e cremes.

No Brasil, existem algumas unidades de multinacionais produtoras de biossurfactantes. De origem nacional, a Innsumo é uma *spin-off* de base biotecnológica, nascida na Universidade Federal de São João del-Rei (MG). Trata-se de uma importante comercializadora de biossurfactantes produzidos a partir do cultivo de microrganismos, que atende os mais diversos setores industriais.

Os biossurfactantes, porém, ainda possuem um alto custo de produção. Embora essa produção possibilite o uso de substratos renováveis e diferentes espécies de microrganismos, além da possibilidade de variação de diversos parâmetros no cultivo e obtenção de compostos com características e propriedades distintas; o ponto de vista econômico não permite uma maior

competitividade com os surfactantes químicos. Estima-se que cerca de 30% do custo total de produção está vinculado à obtenção dos substratos. Por isso, esse problema pode ser reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, disponíveis com facilidade e de baixo custo, como resíduos agroindustriais (Marinho; Silva; Luna, 2022; Cameotra; Makkar, 1998).

Dias *et al* (2018, p. 399) destaca que:

A utilização de substratos não convencionais, sobretudo renováveis, é uma estratégia de produção interessante devido ao baixo custo oferecido, constituindo um dos fatores mais importantes para a viabilização econômica em escala industrial. Nos últimos anos diversas pesquisas foram realizadas com base na utilização de substratos alternativos para a produção de biossurfactantes de origem microbiana: manipueira, melão, glicerol, vinhaça que são normalmente considerados subprodutos em muitos processos industriais.

3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES

O primeiro passo na produção de biossurfactantes é escolher uma cepa adequada de microrganismo. O tipo de microrganismo utilizado, assim como a composição do meio, características do substrato e outros parâmetros durante o cultivo são essenciais para determinar a quantidade e qualidade do biossurfactante produzido. Com as condições adequadas de nutrientes, a síntese de biossurfactantes pode ocorrer tanto dentro quanto fora da célula do microrganismo. Ela também pode acontecer durante a fase exponencial de crescimento das células ou na fase estacionária. Além disso, a natureza do biossurfactante é determinada a partir da origem do microrganismo e pelas técnicas de isolamento utilizadas (Karnwal *et al.*, 2023).

As principais classes de biossurfactantes estão dispostas na Tabela 2, sendo elas: glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Nitschke; Pastore, 2002). Os microrganismos normalmente utilizam uma série de fontes de carbono para o crescimento, como hidrocarbonetos, gorduras e óleos ou misturas oleosas. As bactérias, leveduras e fungos filamentosos possuem a capacidade de crescer em diferentes substratos, produzindo biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares e propriedades emulsificantes. Os gêneros que mais se destacam são: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Torulopsis*, *Acinetobacter*, *Candida*, entre outros (Marinho; Silva; Luna, 2022; Santos *et al*, 2021).

Tabela 3.2 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

Classe/Tipo de Biossurfactante	Microrganismos
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Candida bombicola, Candida apicola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxim	<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>
Mannan-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactante particulado	
Vesícula	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Fonte: Marinho, Silva e Luna, 2022.

Segundo Santos *et al.* (2016), diversos estudos reportam os mais diversos microrganismos produtores de biossurfactantes, porém os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* ganham o maior destaque nessa área. Marinho, Silva e Luna (2022) abordaram as bactérias como as maiores responsáveis pela produção de biossurfactantes, com os primeiros relatos datados de 1949.

O gênero de bactérias *Bacillus* é conhecido como o produtor mais eficiente de biossurfactantes lipopeptídeos, também conhecidos por surfactantes de grande eficiência. Essa produção ocorre, muito provavelmente, devido ao mecanismo de proteção das células ao ataque de outros microrganismos. Os biossurfactantes produzidos por esses microrganismos podem

ser divididos em três tipos, dependendo da sequência de aminoácidos presente na molécula: surfactinas, iturinas e fengicinas. A surfactina é um dos biossurfactantes mais poderosos e mais estudados, devido à sua capacidade de reduzir a tensão superficial, mesmo em baixas concentrações, além de apresentar propriedades antibióticas e antivirais (Vale *et al.*, 2023; Marinho; Silva; Luna, 2022).

As *Pseudomonas* produzem principalmente ramnolipídeos, que possuem alta atividade surfactante (Oliveira Schmidt, 2021). As leveduras *Torulopsis* spp. produzem soforolipídeos e a *Candida* spp. produz especialmente liposam e fosfolipídeos (Santos *et al.*, 2021). As leveduras também são capazes de produzir biossurfactantes com uma alta eficiência para ser utilizado em indústrias, particularmente as descritas como lipases positivas e oleaginosas, acumuladoras de lipídeos intracelulares. É possível encontrar, ainda, estudos da produção pelos mais diversos gêneros de fungos, como *Rhotodorula*, *Pichia*, *Aspergillus*, entre outros (Oliveira, 2021).

3.2.1 *Bacillus pumilus*

O *Bacillus pumilus* é uma bactéria gram-positiva, com formato de bastonete e formadora de endósporos. Normalmente é encontrada em ambientes diversos incluindo solos e tecidos de plantas, assim como sedimentos e águas marinhas. Tem resistência a estresses ambientais como baixa disponibilidade de nutrientes, seca, irradiação, radiação UV, entre outros (Dobrzyński; Jakubowska; Dybek, 2022; Pudova *et al.*, 2022).

A espécie *Bacillus pumilus* pode ser classificada como microrganismo promotor de crescimento vegetal (MPCV), que como o próprio nome indica, pode estimular o crescimento de plantas de forma direta ou indireta. De forma direta, o micróbio atua diretamente no crescimento da planta, já de forma indireta há a inibição de organismos patogênicos de plantas, através da produção de antibióticos ou enzimas (Dobrzyński; Jakubowska; Dybek, 2022).

Os biossurfactantes produzidos pelo *B. pumilus* podem ser aplicados na biorremediação de poluentes. Eles agem na solubilização e degradação de hidrocarbonetos de petróleo, especialmente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, além da capacidade de quelar íons de metais pesados (Dasgupta *et al.*, 2023).

Jigna, Gordhanbhai e Kurian (2022) estudaram a produção de melanina produzida por uma cepa de *Bacillus pumilus* isolada de uma amostra de água do mar. As propriedades bioativas do pigmento o fazem um grande candidato para utilização em produtos cosméticos.

Em outro estudo, Sanghvi *et al.* (2016) reportaram a produção de queratinase pelo microrganismo e a sua aplicação em cosméticos para os cabelos.

3.3 UTILIZAÇÃO DE SUBSTRATOS

3.3.1 Caldo de Cana-de-açúcar

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), referentes à safra de 2023/24, o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Ainda, de acordo com Hamerski (2009), a cultura da cana-de-açúcar apresenta grande importância no agronegócio brasileiro e uma enorme versatilidade, sendo utilizada da forma mais simples, como ração animal, até a mais nobre, como o açúcar. Por isso, a agroindústria da cana integra sistemas de produção alimentar, não alimentar e energéticos, tendo uma vantagem em relação a outras matérias-primas pelo fato de o Brasil apresentar o menor custo de produção do mundo.

O caldo de cana é uma bebida energética altamente nutritiva, extraída pela mastigação ou trituração da cana-de-açúcar. É constituído basicamente por água (70 - 80%) e sólidos solúveis (15 - 25%) compostos por carboidratos fermentáveis, como a sacarose, glicose e frutose. Além disso, possui outros compostos orgânicos (0,8 a 2%), como ceras, ácidos orgânicos e substâncias nitrogenadas, também os compostos inorgânicos (0,8 a 2%), representados pelas cinzas (Corbion *et al.*, 2023; Sousa Filho *et al.*, 2015).

A qualidade do caldo de cana pode variar significativamente. Parâmetros como a quantidade de açúcares, principalmente a sacarose, quantidade dos sólidos solúveis totais (°Brix) e até a coloração do caldo podem determinar o seu nível de pureza (Jegatheesan *et al.*, 2012).

A sacarose, depois da água, é o componente mais abundante no caldo de cana. Esse composto está susceptível a reações de decomposição em meios ácido e básico, assim como por efeito de temperatura. Em meio ácido, ocorre a reação de inversão da sacarose, transformando-a em glicose e frutose. Em meio alcalino, há a formação de furfural, acetona, gliceraldeídos, ácido lático, ácido acético, ácido fórmico e dióxido de carbono, entre outras substâncias. Em temperaturas elevadas, a sacarose desencadeia um conjunto complexo de reações químicas, originando produtos coloridos. Por isso, as condições do caldo de cana devem ser monitoradas durante o seu processamento, minimizando a perda de sacarose (Hamerski, 2009).

A glicose e frutose, naturalmente presentes no caldo de cana ou formadas a partir da hidrólise da sacarose, representam os açúcares redutores. Já os ácidos orgânicos estão presentes na própria cana-de-açúcar. No caldo de cana, já foram identificados os seguintes ácidos: cítrico, málico, oxálico, acético, mesacônico, succínico, fumárico, serínico e aconítico. As ceras e gorduras estão presentes na casca da cana-de-açúcar e são incorporadas ao caldo no processo de extração. Por serem de baixa densidade, se acumulam na parte superior do caldo, em forma de espuma (Hamerski, 2009).

Os compostos nitrogenados estão presentes no caldo da cana-de-açúcar, como amônia e amino-compostos, principalmente. Compreendem as amidas de aminoácidos (asparagina e glutamina), compostos de alta massa molecular (proteínas) e aminoácidos (ácido aspártico e glutâmico) (Sharma; Johary, 1984). Os constituintes inorgânicos da cana-de-açúcar ocorrem na forma de íons, sais, integrantes de complexos moleculares orgânicos ou como compostos insolúveis. Os principais cátions são o potássio, elemento que aparece em maior quantidade (60% das cinzas presentes no caldo), cálcio, ferro, alumínio, sódio, magnésio, manganês, cobre, zinco e boro. Entre os ânions destacam-se os fosfatos, cloretos, sulfatos, nitratos, silicatos e oxalatos (Chen; Chou, 1993). Por conter uma diversidade de nutrientes e alta atividade de água, o caldo de cana é um excelente substrato para o crescimento de uma microbiota diversa.

3.3.2 Melaço de Cana-de-açúcar

O melaço é um subproduto do processo de fabricação de açúcar, sendo resultante da etapa de centrifugação ou de decantação. Possui em sua composição 75% de matéria seca, das quais: 48 – 56 % são açúcares, 9 – 12 % é matéria orgânica não açucarada, 2 – 4% de proteínas e o restante são minerais. Os açúcares presentes são açúcares redutores e parte da sacarose não cristalizada, além de outros açúcares de cadeias orgânicas mais complexas e de difícil degradação. Todos esses açúcares são fermentescíveis (Makkar; Cameotra, 1997; Villavicencio; Sant'Anna; Tôrres, 1999). A composição química do melaço pode ser influenciada por diversos fatores, seja sua origem agrícola ou o seu processamento industrial (Melo, 2003).

O melaço é um substrato com inúmeras aplicações industriais possíveis, sendo utilizado na fermentação para produção de álcool, principalmente etanol, além de também ser matéria-prima para fabricação de cachaça, rum e fermentos biológicos (Oliveira, 2014). Por isso, é uma interessante alternativa para a produção de biossurfactantes, já que, em comparação com outras

fontes de açúcares, possui um baixo custo, e ainda, apresenta vários outros compostos ricos em carbono, além da sacarose. Esses compostos incluem minerais, compostos orgânicos e vitaminas, que são valiosos para os processos de fermentação (Makkar; Cameotra, 1997).

4 METODOLOGIA

4.1 SUBSTRATOS

Para composição dos meios de cultivo foram escolhidos caldo de cana e melação de cana-de-açúcar, a fim de testá-los quanto a eficiência na produção de biossurfactantes. Além disso, também foi utilizado um meio comercial.

O caldo de cana foi obtido de vendedores locais na cidade de João Pessoa e acondicionado em garrafas plásticas sob refrigeração até a sua utilização. O melação foi obtido em um mercado da cidade de João Pessoa e conservado em local seco e fresco, seguindo as recomendações do rótulo do produto.

Figura 5 - Caldo e melação de cana-de-açúcar utilizados como substratos para composição dos meios de cultivo.



O meio comercial utilizado foi o caldo nutricional, que possui em sua composição peptona (5 g.L^{-1}), cloreto de sódio (5 g.L^{-1}), peptona de carne ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) e extrato de leveduras ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$).

O caldo de cana e o melação foram caracterizados quanto ao pH, sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$) e açúcares redutores totais (ART).

A medida do potencial hidrogeniônico das amostras foi determinada através de medidas diretas em um pHmetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Para determinar o teor de sólidos solúveis totais ($^{\circ}\text{Brix}$) foi utilizado um refratômetro digital de bancada. A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi determinada utilizando o método do DNS, proposto inicialmente por Miller (1959) e adaptado por Vasconcelos, Pinto e de Aragão (2013).

4.2 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi o *Bacillus pumilus* isolado do solo cultivado de cana-de-açúcar de uma usina da região e cedido pelo centro de Biotecnologia da UFPB. A cultura foi mantida em meio Ágar Nutriente. Os microrganismos foram repicados periodicamente para manter a viabilidade celular, incubados a 30°C por 24h e posteriormente mantido sob refrigeração a 4°C.

Figura 6 - Microrganismo *B. pumilus* utilizado para o repique.



4.3 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Para o meio comercial, o inóculo foi preparado transferindo-se três alçadas da cepa do microrganismo, em triplicata, para erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo caldo nutriente, previamente esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 30°C e agitação orbital de 180 rpm. Foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm em intervalos de tempo durante 27 horas, afim de acompanhar o crescimento microbiano.

Para o meio com caldo de cana, o inóculo foi preparado seguindo a metodologia de Oliveira (2021): transferiu-se três alçadas da cepa do microrganismo, em triplicata, para erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL do meio de cultivo caldo de cana (caldo diluído para ter 20 g.L⁻¹ de ART), extrato de levedura (1 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (7 g.L⁻¹), previamente esterilizado em autoclave a 105°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. Foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm em intervalos de tempo durante 24 horas, afim de acompanhar o crescimento microbiano.

Para o meio com o melão, o inóculo foi preparado de forma análoga ao meio com caldo de cana, transferindo-se três alçadas da cepa do microrganismo, em triplicata, para erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL do meio de cultivo melão (melão diluído para ter 20 g.L⁻¹ de ART), extrato de levedura (1 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (7 g.L⁻¹), previamente esterilizado em autoclave a 105°C por 15 minutos e incubado em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm. Foram realizadas leituras de absorvância a 600 nm em intervalos de tempo durante 24 horas, afim de acompanhar o crescimento microbiano.

4.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Experimentos foram realizados para estudo da cinética de crescimento do microrganismo em meios de cultivo distintos. A composição do meio utilizado foi descrita por Oliveira (2021): caldo de cana ou melão (diluídos de modo a ter 20 g.L⁻¹ de ART), extrato de levedura (1 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (3 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (7 g.L⁻¹). A produção de biossurfactantes ocorreu por meio de um processo de cultivo submerso, em que foram utilizados frascos de erlenmeyers de 1000 mL, contendo 610 mL de meio. O meio foi previamente esterilizado a 105 °C por 15 minutos e inoculado com uma concentração de células de 10% (v/v). Após isso, os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora a 34°C e agitação orbital de 200 rpm por 48h. Amostras foram retiradas a cada 2h até 12h para o acompanhamento cinético e após isso a cada 24h até o fim do cultivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e sob as mesmas condições de temperatura, agitação pH e concentração de inóculo. Nestes experimentos foram analisados o crescimento microbiano, pH inicial e final, além da porcentagem de índice de emulsificação.

A determinação do crescimento celular foi realizada por três métodos foram utilizados: turbidimetria, peso seco e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para determinar o crescimento celular pelo método da turbidimetria foram realizadas medidas da densidade óptica das amostras por meio de um espectrofotômetro na faixa do visível a um comprimento de onda de 600 nm. Para a determinação da concentração celular em g.L⁻¹ foi construída uma curva de calibração que correlaciona a absorvância do meio ao peso seco da amostra. Já para determinar a concentração em UFC.L⁻¹ a curva de calibração construída correlaciona a absorvância à quantidade de Unidades Formadoras de Colônias.

Para a obtenção do peso seco da amostra foi retirada uma alíquota de 2 mL do meio após 27 horas de cultivo, colocada em tubo previamente seco e pesado, e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos. Passado esse tempo, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado foi seco em estufa à 80°C por 24 horas. Então, o tubo foi resfriado em dessecador

por 1 hora e pesado. Esse procedimento foi realizado em triplicata. A concentração em g.L⁻¹ da amostra foi obtida através da equação:

$$\text{Peso seco (g/L)} = \frac{m_2 - m_1}{V}$$

Onde:

m₁ = massa dos tubos eppendorfs vazios (g)

m₂ = massa dos tubos com pellet de células secas (g)

V = volume da amostra (L)

Para realizar a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi realizada uma diluição em série, onde foi retirada uma alíquota de 1 mL do meio, ao final do cultivo, e inserida em tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril e, posteriormente, agitado, realizando a diluição até 10⁻⁷. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL da diluição e espalhada em placa de Petri contendo ágar nutriente, incubada a 30°C por 24 horas. Passado esse tempo, contou-se as colônias que cresceram. Esse procedimento foi realizado para as duas maiores diluições (10⁻⁶ e 10⁻⁷) ambos em duplicata. O número de colônias estatisticamente válido é de 20 a 200 colônias por placa.

A medida do potencial hidrogeniônico das amostras foi determinada através de medidas diretas em um pHmetro, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Para determinar a quantidade de sólidos solúveis totais (°Brix) utilizou-se um refratômetro digital de bancada.

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

O índice de emulsificação foi então determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100 de acordo com a equação proposta por Wei, Lai e Chang (2007).

$$IE_{24} = \frac{H_E}{H_T} \times 100$$

Onde:

IE₂₄ = índice de emulsificação após 24h
 H_E = altura emulsificada
 H_T = altura total

4.5 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

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

Produtividade em biomassa expressa a velocidade média do crescimento microbiano, onde se verifica a quantidade de biomassa produzida ao longo do tempo de cultivo. O cálculo é realizado conforme a Equação

$$P_x = \frac{X - X_0}{t}$$

Onde:

X = concentração final de células

X₀ = concentração inicial

t = tempo de cultivo em horas

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

$$\ln X = \mu_{m\acute{a}x}(T - T_i) + \ln X_i$$

Onde:

X = Quantidade de biomassa produzida

$\mu_{m\acute{a}x}$ = Velocidade específica máxima

T = Tempo de cultivo

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

$$T_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Onde:

T_g = Tempo de geração

$m_{m\acute{a}x}$ = Velocidade específica máxima

4.6 SEPARAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

O sobrenadante livre de células foi colocado em frascos previamente pesados, o biossurfactante foi separado por precipitação com etanol absoluto (1:3 v/v) e em seguida mantido em repouso por 24 h em uma temperatura de 4°C. Após esse procedimento foi realizada a filtração e o precipitado foi seco em estufa a 45°C até peso constante. A massa livre de umidade foi pesado e seu peso seco foi expresso em g/L.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

A caracterização foi realizada com o objetivo de adequar tanto o caldo de cana-de-açúcar quanto o melaço para o processo. A Tabela 5.1 apresenta os resultados da caracterização de ambos.

Tabela 5.1 - Características físico químicas do caldo e do melaço de cana-de-açúcar.

Parâmetro	Caldo de Cana	Melaço
pH	5,01	5,42
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	18	80,6
ART (g/L)	201,53	1016

O pH encontrado foi de 5,01 e 5,42 para o caldo e o melaço, respectivamente. Esses valores não são considerados ideais para o cultivo de bactérias, pois, segundo Alves et al. (2018), o pH ótimo para o crescimento desses microrganismos está entre 6,5 a 7,5. Já a concentração de ART foi extremamente elevada, principalmente para o melaço. Por isso, foi necessário realizar a diluição com água destilada, de ambos os meios, para que a concentração ficasse em torno de 20 g/L de ART. Essa diluição também faz com que o pH do meio aumente, já que o pH da água destilada normalmente está próximo da neutralidade, em torno de 7,0.

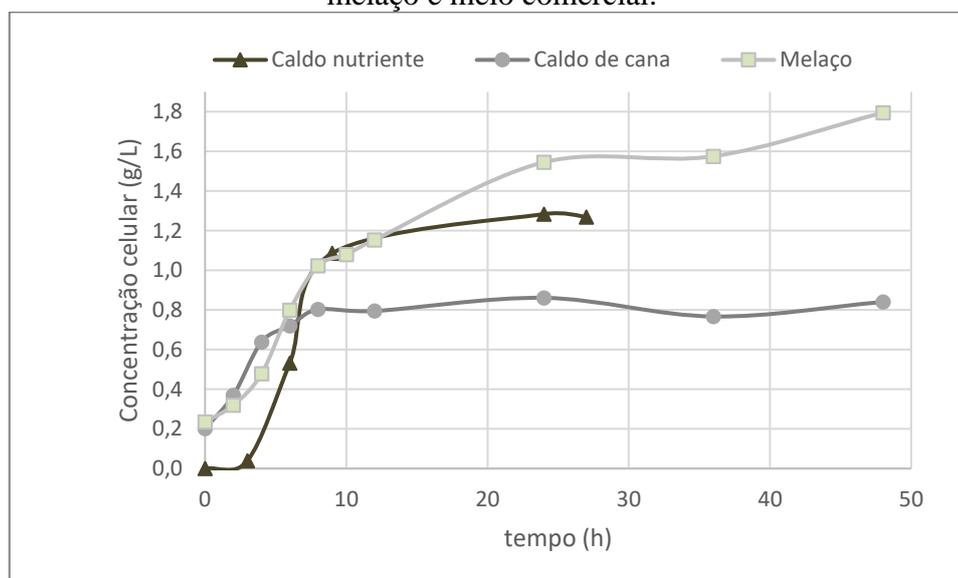
5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A cinética dos cultivos com *Bacillus pumilus* nos três meios distintos foram analisadas quanto ao crescimento celular, variação de sólidos solúveis totais (°Brix) e variação do pH.

A Figura 7 descreve a cinética do *Bacillus pumilus* no meio comercial, no meio composto por caldo de cana e no meio composto por melaço. É possível observar que, em todos os meios, o crescimento exponencial do microrganismo ocorreu entre 0 e 24h. No caldo nutriente, a concentração celular máxima foi de 1,28 g/L em 24 h. Esse cultivo encerrou-se com 27 h, mas este ponto se manteve praticamente constante em relação ao anterior, indicando o início da fase log. No meio composto por caldo de cana, a concentração celular máxima foi de 0,86 g/L em 24 h. Após esse período, a concentração celular diminui levemente, indicando o

início da fase estacionária. Já no meio composto por melaço encontrou-se uma concentração celular de 1,54 g/L em 24 h. Após esse período os valores se mantiveram praticamente constantes, com concentração celular máxima de 1,79 g/L após 48 h de cultivo.

Figura 7 - Cinética de crescimento para o *Bacillus pumilus* nos meios com caldo de cana, com melaço e meio comercial.

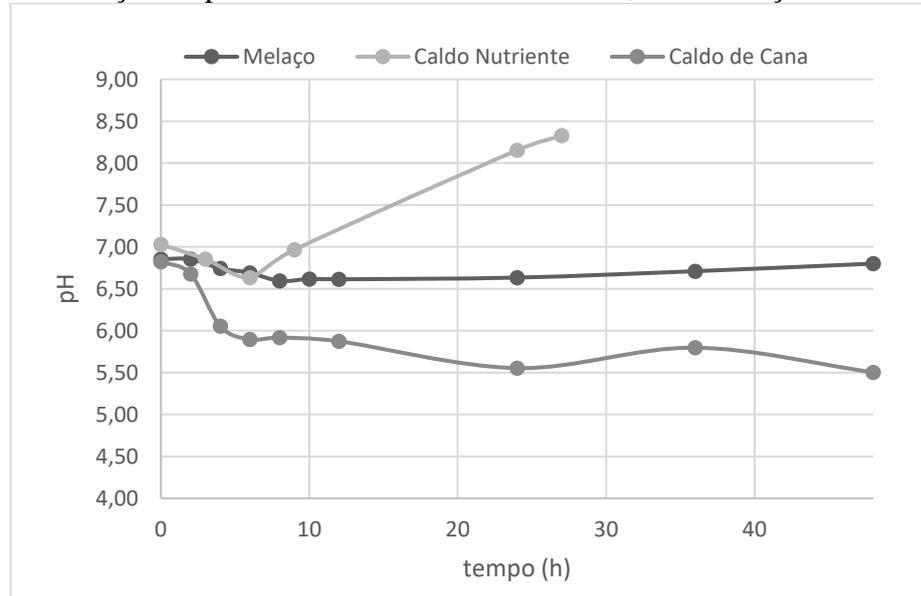


Fazendo um comparativo do comportamento dos microrganismos nos meios propostos, observa-se que o meio composto com melaço foi o que mais favoreceu o crescimento da concentração celular. Isso pode ser explicado por Oliveira (2014), que traz o fato de que o melaço apresenta em sua composição compostos minerais, compostos orgânicos e vitaminas que podem favorecer o crescimento do microrganismo, além de apresentar outros compostos ricos em carbono, fora a sacarose, que melhoram o processo fermentativo. Ademais, os valores de concentração celular para o meio composto com caldo de cana foram bem abaixo dos encontrados por Oliveira (2021), o que pode ser justificado por alguma baixa oxigenação ou falta de algum outro nutriente que acabou limitando o crescimento celular.

Medidas de pH foram realizadas durante o cultivo para verificar possíveis alterações, como mostrado na Figura 8. O pH inicial dos meios foi de 7,03; 6,85 e 6,82 para o meio comercial, o meio com melaço e o meio com caldo de cana, respectivamente, chegando a 8,33; 6,80 e 5,50 no final dos cultivos. A partir desses valores também fica evidente mais um motivo do melaço ter apresentado o melhor crescimento, já que seu pH quase não variou e estava sempre dentro da faixa ótima para crescimento de bactérias. Embora o meio com caldo de cana fosse adicionado de sais, que além de auxiliar na síntese dos biossurfactantes também funcionam como tamponantes para o meio, foi observado uma queda nos valores de pH durante

todo o cultivo quando comparados com o pH inicial. Segundo Oliveira (2021), essa diminuição pode estar associada ao catabolismo dos carboidratos, que resulta na produção de ácidos.

Figura 8 - Variação de pH nos meios com caldo de cana, com melação e meio comercial.



Os parâmetros cinéticos dos cultivos estão apresentados na Tabela 5.2. A fase exponencial de crescimento do microrganismo para todos os meios está situada entre 0 e 12 h. Para o meio comercial a produtividade em células foi de 0,1274 g/L.h, enquanto para o meio com caldo de cana e melação foram de 0,1124 g/L.h e 0,1107 g/L.h, respectivamente. Esses valores estão consideravelmente próximos, indicando que o *B. pumilus* teve o crescimento favorecido em todos os meios.

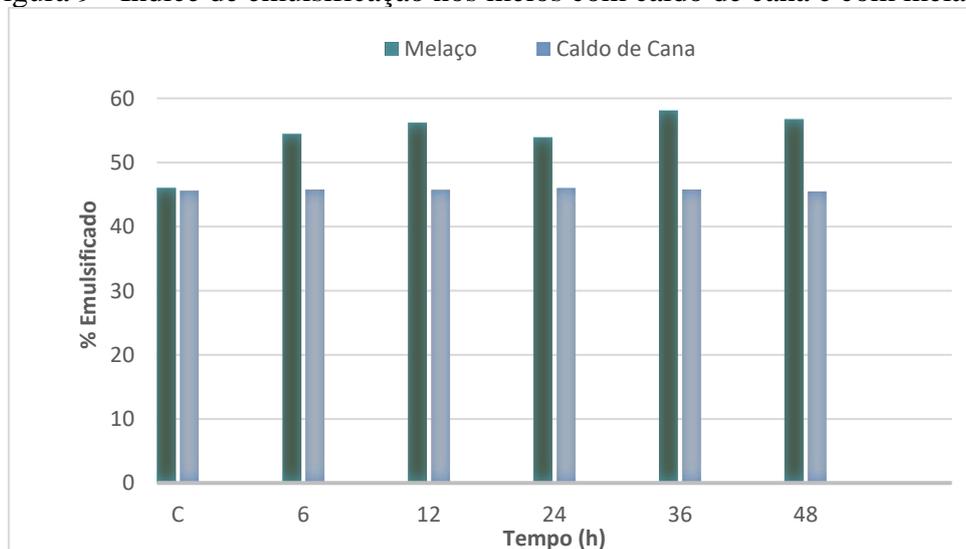
A velocidade máxima específica de crescimento do microrganismo foi de 0,2210 h⁻¹, 0,4214 h⁻¹ e 0,7780 h⁻¹ para os meios caldo de cana, caldo nutriente e melação, respectivamente. Esses valores indicam que o microrganismo se adaptou melhor ao meio contendo melação, o que também é observado no tempo de geração que apresentou valores de 0,89 h, 1,65 h e 3,14 para o melação, caldo nutriente e caldo de cana, respectivamente. Esses resultados indicam que apesar do *B. pumilus* ter o crescimento favorecido em todos os meios, os outros parâmetros indicam que o microrganismo teve a melhor adaptação no meio com melação.

Tabela 5.2 - Parâmetros cinéticos para *B. pumilus* nos meios caldo nutriente, caldo de cana e melão.

Parâmetros cinéticos	Caldo nutriente	Caldo de Cana	Melão
P_x (g/L.h)	0,1274	0,1124	0,1107
m_x (h^{-1})	0,4214	0,2210	0,7780
T_g (h)	1,65	3,14	0,8900

O índice de emulsificação é um dos principais parâmetros para avaliar a produção de biossurfactantes. A porcentagem que um determinado meio é emulsionado indica a presença, ou não, dessas biomoléculas. As porcentagens de emulsificação ao longo do cultivo utilizando a cepa do *Bacillus pumilus*, testadas nos meios com caldo de cana e com melão estão presentes na Figura 6. Também foi realizada a análise em uma amostra controle de meio sem adição de microrganismo, para efeito de comparação. Todos os experimentos foram realizados utilizando óleo de soja como componente lipofílico para análise do IE.

Figura 9 - Índice de emulsificação nos meios com caldo de cana e com melão.



Analisando o IE das 6 primeiras horas de cultivo para o meio com melão, observa-se um percentual de emulsificação de 54,43%, que comparado com a amostra controle apresenta um aumento de 8,41%, indicando que há produção de biossurfactante no cultivo. No tempo de 12 h há um aumento discreto no IE, apresentando um valor de 56,19%. Em seguida, no tempo de 24h, o percentual sofre uma redução de 2,3% e novo aumento em 36 h, apresentando um IE de 58,09%, indicando sua maior produção na fase estacionária. Ron e Rosenberg (2001)

reportaram em seus estudos que a produção de bioemulsificantes por bactérias está diretamente relacionado com a maior concentração de células. Tal afirmação é comprovada nos experimentos do melão, onde verifica-se maior produção do biossurfactante quando há maior concentração celular.

Para o meio com caldo de cana, observou-se que o IE ficou praticamente estável, apresentando seu valor máximo de 45,99% no tempo de 24 h, correspondendo a um aumento de apenas 0,4% em comparação com a amostra controle. A explicação está no crescimento celular limitado que o experimento apresentou, afetando a produção do biossurfactante.

A quantidade de biossurfactante separado através da precipitação com etanol absoluto foi de 3,7382 g/L e 4,2510 g/L para os cultivos com caldo de cana e melão, respectivamente.

Figura 10 - Biossurfactante extraído do cultivo com caldo de cana.



6 CONCLUSÕES

Os substratos avaliados se mostraram favoráveis ao crescimento microbiano e produção de biossurfactante pela cepa de *Bacillus pumilus*.

Os maiores percentuais de emulsificação foram obtidos durante o processo, entre 24 e 36 h. O meio composto por melaço indicou uma produção bem mais expressiva de biossurfactante quando comparado ao meio com caldo de cana, apresentando resultados próximos de 55% no índice de emulsificação nas primeiras 6 h de cultivo.

O estudo da cinética de crescimento celular demonstrou que os meios apresentam comportamentos semelhantes no que diz respeito ao crescimento nos meios compostos por caldo de cana, melaço e o meio comercial.

O melaço favoreceu de forma expressiva o crescimento de microrganismos quando comparado aos outros. Já o caldo de cana apresentou um crescimento razoável, mas bem inferior comparado com o meio comercial. Com relação à produção de biossurfactantes, foi possível observar um comportamento similar nos testes de índice de emulsificação, tendo o melaço favorecido a emulsificação apresentando resultado satisfatório de 58,02% em 36 h de cultivo.

Diante disso, é possível concluir que o microrganismo é um bom produtor de biossurfactante, com boa capacidade de emulsionar, apresentando resultados satisfatórios. Os substratos utilizados indicam ser promissores na produção de biossurfactante, mas ainda necessitam de estudos mais aprofundados do cultivo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. M. et al. Determinação de pH ótimo para o crescimento bacteriano em meios alternativos. *In: Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão*, 12., 2018, Janaúba. **Apresentação de trabalho científico** [...]. Janaúba: Unimontes, 2018.
- BARROS, F.F. C.; QUADROS, C. P. de; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 979 – 985, out./dez. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000400034>. Acesso em: 10 set. 2024.
- BASF. **Notícias: BASF reforça posição no mercado em biossurfactantes para produtos sustentáveis, naturais e biodegradáveis**. Brasil: BASF, [2021]. Disponível em: https://www.basf.com/br/pt/media/news-releases/2021/01/BASF_reforca_posicao_mercado_biossurfactantes_para_produtos_sustentaveis_naturais_biodegradaveis. Acesso em: 02 out. 2024.
- BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) –Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/58c6663b-3251-489c-a880-d6842d8007e9/content>. Acesso em: 06 set. 2024.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R. Synthesis of Biosurfactant in Extreme Conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520 – 529, 1998.
- CHEN, J.C.P.; CHOU, C. **Cane Sugar Handbook**. A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12.ed, New York John Wiley & Sons, 1993.
- COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. G. Surface active agentes from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.224 – 229,1987.
- CORBION, C. et al. An overview of Spirits made from sugarcane juice. **Molecules**, v. 28, n. 19, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28196810>. Acesso em: 21 set. 2024.
- DASGUPTA, A. et al. Characterization of pumilacidin, a lipopeptide biosurfactant produced from *Bacillus pumilus* MITDI1 and its prospect in bioremediation of hazardous pollutants. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 274, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03619-4>. Acesso em: 01 out. 2024.
- DIAS, E. C. et al. Utilização do extrato aquoso da algaroba na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 397 – 412, mai./ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.35572/rsc.v7i2.125>. Acesso em: 20 set. 2024.
- DOBZYNSKI, J., JAKUBOWSKA, Z., DYBEK, B. Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1069053>. Acesso em: 01 out. 2024.

FAKRUDDIN, M. Biosurfactant: production and application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 4, 2012. DOI <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.1000124>.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Biosurfactants market**. Fortune Business Insights, [2024]. Disponível em: <https://www.fortunebusinessinsights.com/biosurfactants-market-+102761>. Acesso em: 02 out. 2024.

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) –Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

INNSUMO. **Nossa Missão**. Innsumo []. Disponível em: <https://innsumo.com.br/>. Acesso em: 02 out. 2024.

JEGATHEESAN, V. et al. Evaluating membrane technology for clarification of sugarcane juice. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 11, p. 109 – 124, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9271-1>. Acesso em: 21 set. 2024.

JIGNA, C.; GORDHANBHAI, P. M.; KURIAN, N. K. Bacterial melanina with immense cosmetic potential produced by marine bacteria *Bacillus pumilus* MIN3. **Preprints**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.20944/preprints202205.0296.v1>. Acesso em: 01 out. 2024.

KARNWAL, A. et al. Microbial biosurfactant as an alternate to chemical surfactants for application in cosmetics industries in personal and skin care products: a critical review. **BioMed Research International**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/2375223>. Acesso em: 19 set. 2024.

MARINHO, P. S. da S.; SILVA, R. R. da; LUNA, J. M. de. Biosurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, set. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34123>. Acesso em: 11 set. 2024.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 7, p. 887 – 889, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0233-7>. Acesso em: 21 set. 2024.

MEIRA, D. R. **Produção de biosurfactante utilizando melancia como meio de cultivo: síntese em cepas do microrganismo *Bacillus pumilus***. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022.

MELO, F. de A. D. **Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogloea* sp em melaço de cana-de-açúcar**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –Escola de Engenharia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/6828>. Acesso em: 21 set. 2024.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, 1959.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772 – 776, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/sBY9nNYxC5zN5wK3gxLsK9p/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 16 set. 2024.

OLIVEIRA, C. Z. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus* em meio com caldo de cana-de-açúcar**. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) –Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2021.

OLIVEIRA, J. G. de. **Utilização de melaço, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo**. 2014. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

OLIVEIRA, J. G. de; GARCIA-CRUZ, C. H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 155 – 160, jan./fev. 2013.

de OLIVEIRA SCHMIDT, V. K. et al. Biosurfactant inducers from Enhanced production of surfactin and rhamnolipids: an overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02970-8>. Acesso em: 14 set. 2024.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104 – 2108, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000800022>. Acesso em: 22 set. 2024.

PUDOVA, D. S. Comparative genome analysis of two *Bacillus pumilus* strains producing high level of extracellular hydrolases. **Genes**, v. 13, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13030409>. Acesso em: 01 out. 2024.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229 – 236, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>. Acesso em: 18 set. 2024.

SANGHVI, G. et al. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 256 – 262, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.067>. Acesso em: 01 out. 2024.

SANTOS, C. V. M. et al. Biossurfactante – conceitos gerais e perspectivas. *In*: PACHECO, C. S. G. R. **Ambiente e Sociedade**: concepções, fundamentos, diálogos e práticas para conservação da natureza. 1. ed., Editora Científica, 2021. cap. 22, p. 319 – 342. DOI: <https://dx.doi.org/10.37885/210604986>. Acesso em: 05 set. 2024.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>. Acesso em: 18 set. 2024.

SANTOS, S. C. dos. Biossurfactantes: potenciais agentes biorremediadores. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 5, p. 1531 – 1540, dez. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v12i5Especial.33191>.

SARUBBO, L. A. et al. Biosurfactants: production, properties, applications, trends and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.

SHARMA, D.; KALITA, S.; DUARAH, K. Isolation and characterization of bio surfactant producing micro organisms and to determine it's in vitro Antagonistic activity against phytopathogenic fungi. **International Journal of Current Trends in Scienceand Technology**, v. 7, n. 10, p. 20355-20368, 2017.

SHARMA, N.; LAVANIA, M.; LAL, B. Biosurfactant: na emerging tool for the petroleum industries. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254557>. Acesso em: 18 set. 2024.

SHARMA, S.C.; JOHARY, P.C. Amino-acid removal during cane juice clarification. **International Sugar Journal**, v.86, n.1021, p.7-11, 1984.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 2 – 13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14057>.

SOUSA FILHO, J. W. de et al. Avaliação do efeito da irradiação micro-ondas no caldo de cana-de-açúcar como tratamento preliminar para produção de açúcar e etanol. **Eclética Química**, v. 40, p. 16 – 31, 2015. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42955129002>. Acesso em: 21 set. 2024.

VALE, K. do V. et al. Biosurfactant production by isolated bacteria from petroleum industry's effluente targeting bioremediation. **Results in Chemistry**, v. 6, 2023. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101038>. Acesso em: 05 set. 2024.

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

VILLAVICENCIO, A. R. N.; SANT'ANNA, E. S.; TÔRRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89131999000200015>. Acesso em: 21 set. 2024.

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