

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

ALYSSON HENRIQUE DE ALBUQUERQUE ALVES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES
OBTIDOS POR *Bacillus subtilis* (UFPEDA86) E *Bacillus pumilus* EM
EXTRATO AQUOSO DE ALGARROBA**

JOÃO PESSOA – PB

2024

ALYSSON HENRIQUE DE ALBUQUERQUE ALVES

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES OBTIDOS POR
Bacillus subtilis (UFPEDA86) E *Bacillus pumilus* EM EXTRATO AQUOSO DE
ALGARROBA**

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: Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida.

JOÃO PESSOA – PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A474p Alves, Alysson Henrique de Albuquerque.
Produção e caracterização de biossurfactantes
obtidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA86) e *Bacillus*
pumilus em extrato aquoso de algaroba / Alysson
Henrique de Albuquerque Alves. - João Pessoa, 2024.
77 f. : il.

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

1. Emulsificantes. 2. Lipopeptídeos. 3. Substratos
renováveis. 4. Cinética. I. Almeida, Andréa Farias de.
II. Título.

UFPB/BC

CDU 667.629.5(043)

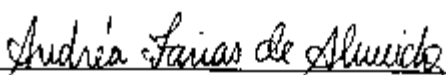
ALYSSON HENRIQUE DE ALBUQUERQUE ALVES

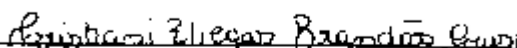
**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES OBTIDOS POR
Bacillus subtilis (UFPEDA86) E *Bacillus pumilus* EM EXTRATO AQUOSO DE
ALGAROA**

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.

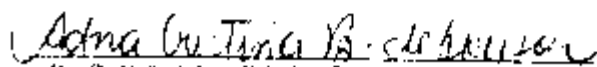
Aprovada em 20 de agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Andréa Farias de Almeida (DBTC/UFPB)
(Orientadora)


Dr.ª Cristiani Viegas Brandão Grisi (PPGEQ/UFPB)
(Examinadora Interna ao Programa)


Prof.ª Dr.ª Sharline Florentino de Melo Santos (DEQ/UFPB)
(Examinadora Interna ao Programa)


Prof.ª Dr.ª Adna Cristina Barbosa de Sousa (DHCM/UFPB)
(Examinadora Externa ao Programa)

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo apoio e incentivo.

A minha orientadora, professora Dra. Andréa Farias de Almeida, pela disponibilidade, ensinamentos e confiança.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp), pelo companheirismo, pelas amizades construídas e dedicação.

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química, aos professores e secretários.

A UFPB e a FAPESQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas com características anfipáticas, ou seja, contêm um componente hidrofílico (polar) e um hidrofóbico (não polar) em sua estrutura molecular, que promovem a redução de tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases. Possuem muitas aplicações em diversos setores, incluindo agricultura, cosméticos, alimentos, farmácia, meio ambiente e petroquímica. Em comparação com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam características como biodegradabilidade, baixa toxicidade, tolerâncias a amplas faixas de temperatura, salinidade e pH, tornando-os aplicáveis em produtos alimentícios, cosméticos e medicamentos. No entanto, devido aos custos elevados de produção, pesquisas estão sendo realizadas com estratégias que visam substituir substratos convencionais por alternativos de baixo custo e de preferência renováveis para produção de biossurfactantes. No presente trabalho, a produção do biossurfactante a partir do *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Bacillus pumilus* foi conduzida usando como substrato o extrato aquoso de algaroba, a 1% (v/v) de concentração. Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer 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, produção de biossurfactante e os parâmetros cinéticos durante 96 h de processo. A recuperação dos biossurfactantes obtidos nos processos foi realizada por precipitação ácida (HCl a 6N) e a caracterização por meio das análises dos grupos funcionais identificados em FTIR. No cultivo utilizando a linhagem *B. subtilis* UFPEDA 86 obteve-se concentração celular na fase exponencial ($[X]$) de 0,78 g/L, produtividade em células (P_x) de 12,07 mg/L.h, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) de 0,0569 h⁻¹, concentração de biossurfactante produzido 2,83 g/L com uma capacidade de emulsificação de 72,1% em óleos lubrificantes. Na produção *B. pumilus* obteve-se uma concentração celular máxima na fase exponencial ($X_{\text{máx.}}$) foi de 1,07 g/L, a produtividade em células (P_x) foi de 8,59 mg/L.h e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) é de 0,0063 h⁻¹. Em relação ao biossurfactante produzido obteve-se uma concentração de 4,73 g/L com boa capacidade de emulsificação 85,4% em óleos lubrificantes. Portanto, com os resultados obtidos até o momento, é possível considerar que as linhagens *B. subtilis* UFPEDA 86 e *B. pumilus* foram capazes de produzir biossurfactante do tipo lipopeptídeo a partir do extrato de algaroba, como substrato alternativo, nas condições propostas.

Palavras-chave: Emulsificantes; Lipopeptídeos; Substratos; Cinética

ABSTRACT

Biosurfactants are molecules with amphipathic characteristics, that is, they contain a hydrophilic (polar) and a hydrophobic (non-polar) component in their molecular structure, which promote the reduction of surface and interfacial tension between liquids, solids and gases. They have many applications in various sectors, including agriculture, cosmetics, food, pharmacy, environment and petrochemicals. Compared to synthetic surfactants, biosurfactants have characteristics such as biodegradability, low toxicity, tolerances to wide ranges of temperature, salinity and pH, making them applicable in food products, cosmetics and medicines. However, due to high production costs, research is being carried out with strategies that aim to replace conventional substrates with low-cost and preferably renewable alternatives to production of biosurfactants. In the present work, the production of biosurfactant from *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) and *Bacillus pumilus* was conducted using mesquite aqueous extract as substrate, at 1% (v/v) concentration. The cultures were carried out in Erlenmeyer flasks shaken in an orbital rotating incubator at 200 rpm, 37°C and an aeration ratio of 0.4. Samples were taken at regular times to monitor microbial growth, substrate consumption, biosurfactant production and kinetic parameters during the 96h process. The recovery of biosurfactants obtained in the processes was carried out by acid precipitation (HCl at 6N) and characterization through analysis of the functional groups identified in FTIR. In cultivation using the *B. subtilis* UFPEDA 86 strain, a cell concentration in the exponential phase ($[X]$) of 0.78 g/L, cell productivity (P_x) of 12.07 mg/L.h, maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.0569 h⁻¹, biosurfactant concentration produced 2.83 g/L with an emulsification capacity of 72.1% in lubricating oils. In *B. pumilus* production, a maximum cell concentration was obtained in the exponential phase (X_{max}) of 1.07 g/L, cell productivity (P_x) was 8.59 mg/L.h and maximum specific growth rate (μ_{max}) is 0.0063 h⁻¹. In relation to the biosurfactant produced, a concentration of 4.73 g/L was obtained with a good emulsification capacity of 85.4% in lubricating oils. Therefore, with the results obtained so far, it is possible to consider that the *B. subtilis* UFPEDA 86 and *B. pumilus* strains could produce lipopeptide-type biosurfactant from mesquite extract, as an alternative substrate, under the proposed conditions.

Keywords: Emulsifiers; Lipopeptides; Surfactin; Substrates; Kinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Biossurfactantes se acumulando na interface entre líquidos e ar	19
Figura 3.2 - Vagem da algaroba	26
Figura 3.3 - Curva de crescimento do microrganismo, a parte superior “A” é representada em ordenadas lineares e na parte inferior “B” a representação semilogarítmica.	29
Figura 3.4 – Curvas da variação das concentrações dos componentes de uma fermentação, onde X, P e S são as concentrações de microrganismo, do produto e do substrato residual no meio, respectivamente.	30
Figura 4.1 - Fluxograma das atividades	32
Figura 4.2 – Preparação para produção de biossurfactantes	36
Figura 4.3- Incubadora rotativa orbital contendo as amostras em frascos Erlenmeyer	37
Figura 4.5 - Fluxograma do processo de recuperação (precipitação ácida)	41
Figura 4.6 - Fluxograma do processo de recuperação (extração líquido-líquido)	42
Figura 5.1 - Produção de biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 86	44
Figura 5.2 - Produção de biossurfactante por <i>Bacillus pumilus</i>	45
Figura 5.3 - Análise de índice de emulsificação com compostos hidrofóbicos (a) óleo vegetal; (b) óleo de motor e (c) querosene.	48
Figura 5.4 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> – Óleo de motor	50
Figura 5.5 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> – Óleo Vegetal	51
Figura 5.6 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> – Querosene	51
Figura 5.7 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> – Óleo de motor	52
Figura 5.8 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> – Óleo vegetal	53
Figura 5.9 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> – Querosene	54
Figura 5.10 - Estabilidade de emulsificação de pH – <i>Bacillus subtilis</i> com Óleo de motor	55
Figura 5.11- Estabilidade de emulsificação de pH – <i>Bacillus subtilis</i> com Óleo vegetal	55
Figura 5.12 - Estabilidade de emulsificação de pH – <i>Bacillus subtilis</i> com Querosene	56
Figura 5.13 - Estabilidade de emulsificação de pH – <i>Bacillus pumilus</i> com Óleo de motor	57

Figura 5.14 - Estabilidade de emulsificação de pH – <i>Bacillus pumilus</i> com Óleo vegetal	57
Figura 5.15- Estabilidade de emulsificação de pH – <i>Bacillus pumilus</i> com Querosene	58
Figura 5.16- Estabilidade de emulsificação de temperatura – <i>Bacillus subtilis</i> com Óleo de motor	59
Figura 5.17 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – <i>Bacillus subtilis</i> com Óleo vegetal	60
Figura 5.19 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – <i>Bacillus pumilus</i> com Óleo de motor	61
Figura 5.20 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – <i>Bacillus pumilus</i> com Óleo vegetal	62
Figura 5.21 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – <i>Bacillus pumilus</i> com Querosene	62
Figura 5.22 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– <i>Bacillus subtilis</i> com Óleo de motor	64
Figura 5.23 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– <i>Bacillus subtilis</i> com Óleo vegetal	64
Figura 5.24 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– <i>Bacillus subtilis</i> com Querosene	65
Figura 5.25 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– <i>Bacillus pumilus</i> com Óleo de motor	66
Figura 5.26 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– <i>Bacillus pumilus</i> com Óleo vegetal	66
Figura 5.27 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– <i>Bacillus pumilus</i> com Querosene	67
Figura 5.28 - Etapas de Recuperação dos Biossurfactantes	68
Figura 5.29 - Espectro na região infravermelho das amostras após recuperação (vermelho) e do padrão da surfactina (preto)	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Categorização dos biossurfactantes e seus microrganismos produtores	17
Tabela 3.2 – Diversas Aplicações dos biossurfactantes	21
Tabela 5.1 - Parâmetros de processo, em incubadora rotativa orbital, para produção de biossurfactantes.	43
Tabela 5.2 - Parâmetros cinéticos do cultivo <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus pumilus</i>	48

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1. SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES	15
3.1.1. Categorização dos biossurfactantes	17
3.1.2. Características dos biossurfactantes	18
3.2. APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	20
3.3. PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	22
3.3.1. <i>Bacillus Subtilis</i> e <i>Bacillus Pumilus</i>	23
3.3.2. Algaroba	24
3.4. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	26
3.5. CINÉTICA DE PRODUÇÃO	28
4. METODOLOGIA	32
4.1. FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES	32
4.2. SUBSTRATO	33
4.1.1. Extrato da algaroba	33
4.1.2. Caracterização físico-química	34
4.1.2.1. Teor de açúcares redutores totais (ART)	34
4.1.2.2. pH e Teor de sólidos solúveis (°Brix)	34
4.1.3. Preparo do meio de cultivo	34
4.2. MICRORGANISMOS	35
4.2.1. Preparo do inóculo	35
4.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	36
4.3.1 Análises do processo de produção de biossurfactantes	37
4.3.1.1 Determinação da concentração de biomassa microbiana	37
4.3.1.2 Determinação da concentração de substrato	38
4.3.1.3 Quantificação do biossurfactante produzido	38

4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	39
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE DO BIOSSURFACTANTE	39
4.5.1. Índice de emulsificação	39
4.5.1.1. Estudo da estabilidade da emulsificação	40
4.5.1.1.1. Estabilidade térmica	40
4.5.1.1.2. Estabilidade frente ao pH	40
4.5.1.1.3. Estabilidade frente a força iônica	40
4.6. RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	40
4.6.1 Precipitação ácida para recuperação do bioproduto	41
4.6.2 Extração líquido-líquido para recuperação do bioproduto	41
4.6.4 Caracterização do biossurfactante produzido	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	43
5.1.1. Comportamento cinético com <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus pumilus</i>	43
5.1.3. Análise dos parâmetros cinéticos da produção de biossurfactantes	47
5.2. ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO	48
5.2.1. Índice de emulsificação com <i>Bacillus subtilis</i>	49
5.2.2. Índice de emulsificação com <i>Bacillus pumilus</i>	52
5.3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE	54
5.3.1 pH	54
5.3.2. Temperatura	59
5.3.3. Estabilidade frente a força iônica	63
6. RECUPERAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	68
7. CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	69
8. CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O avanço dos processos biotecnológicos abriu novas oportunidades em nível global para produção de biomoléculas de interesse comercial. Esses produtos são valorizados por sua eficiência, baixo impacto ambiental, e potencial econômico. Biossurfactantes são exemplos de biomoléculas de origem microbiana com atividades emulsificantes e tensoativas, possuem características peculiares que possibilitam aplicação alternativa aos surfactantes sintéticos em diversas áreas (VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015).

De modo abrangente, os biossurfactantes contêm um componente hidrofílico (polar) e um hidrofóbico (não polar) em sua estrutura molecular, que promovem a redução de tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, permitindo-lhes misturar ou dispersar imediatamente como emulsões ou microemulsões em água ou outros líquidos. Produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular por bactérias, leveduras e fungos a partir de substratos ricos em açúcares, óleos e hidrocarbonetos como fonte de carbono para o desenvolvimento desses microrganismos (DESAI e BANAT, 1997).

Biossurfactantes, representam uma alternativa atrativa em relação aos seus equivalentes sintéticos. Essas biomoléculas possuem diversas vantagens; são biodegradáveis, têm capacidade antimicrobiana, possuem atividade em ampla variedade de condições ambientais, baixa toxicidade e, sobretudo, podem ser produzidos a partir de recursos renováveis. Produzir biossurfactantes em larga escala enfrenta desafios devido a questões relacionadas aos processos de produção e etapas de recuperação e purificação, o pode resultar em aumento nos custos operacionais (GEETHA, IBRAHIM, SANKET, 2018).

O mercado mundial de biossurfactantes é estimado em 18,25 milhões de toneladas em 2024 e deverá atingir 21,52 milhões de toneladas até 2029, com taxa composta de crescimento anual (TCCA) superior a 3,3% no período de 2024 a 2029 (MORDOR INTELLIGENCE, 2024). A produção de biossurfactantes é frequentemente abordada na literatura, com especialistas debatendo a diferença significativa entre investimentos e ganhos monetários. (KOSARIC e VARDAR-SUKAN, 2015). Embora, tenham ainda inúmeros desafios no processo de produção por via microbiana, principalmente, referindo-se ao custo com a matéria-prima e as etapas de recuperação e purificação dos biossurfactantes. Assim, a utilização de compostos ricos nutricionalmente com características sustentáveis para o desenvolvimento microbiano são sempre bem-vindos para tornar os sistemas de produção em larga escala viáveis do ponto de vista econômico e biotecnológico (RIBEIRO et al., 2019).

Os resíduos agrícolas e substratos de baixo custo são considerados promissores para a síntese microbiana dos biossurfactantes, apresentam potencial para reduzir custos operacionais e além do mais, promover destinação sustentável dos resíduos industriais. Por conseguinte, o foco das pesquisas se concentra no emprego de vários recursos naturais renováveis para superar barreiras financeiras na produção industrial de biossurfactante. Substratos como trigo, arroz, algaroba, mandioca, farinha de mandioca, cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar, melaço de beterraba, farelo e milho, devido aos seus níveis de açúcares presentes, são testados para produção de biossurfactantes e a discutir uma nova e eficiente forma do seu uso (CAMPOS et al., 2019; MAKKAR et al., 2011).

O extrato de algaroba é um exemplo desses substratos de origem renovável que pode ser utilizado para produção de biossurfactantes e outras biomoléculas. Isso ocorre porque esses resíduos geralmente contêm os nutrientes necessários, são matérias-primas abundantes e têm baixo custo. O grupo de pesquisa desenvolve processos com a utilização da algaroba, e foi demonstrado seu potencial na produção de biossurfactantes a partir de linhagens de *Bacillus* sp. em alguns trabalhos (DIAS, 2017; FARIAS, 2018 e DIAS, 2019).

Diversos microrganismos podem ser utilizados para produzir biossurfactantes, dentre esses as bactérias do gênero *Bacillus* são as mais pesquisadas. *Bacillus subtilis* é um produtor de uma variedade de biossurfactantes do tipo lipopeptídeo (LP) cíclico, dentre os mais conhecidos são os da família da surfactina, iturina e fengicina. Linhagens como *Bacillus pumilus* (OLIVEIRA, 2010) e *Bacillus safensis* (FARIAS, 2018) também têm sido estudadas para produção de biossurfactantes.

Dentre os LPs, a surfactina é a mais utilizada principalmente como agentes de emulsão e espuma em tecnologias de remediação, e derivados de iturina (antibiótico lipopeptídeo com forte atividade antifúngica) têm forte atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* contra variedade de espécies fúngicas (PECCI et al., 2010).

Desse modo, avaliação da produção de biossurfactantes microbianos utilizando o extrato aquoso da algaroba como substrato poderá traçar alternativas de processo, possibilitando ampliação da escala de produção a baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de produção de biossurfactantes por linhagens de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus* a partir do extrato aquoso de algaroba.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biossurfactantes a partir do *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus* utilizando a concentração de 1% (v/v) de extrato aquoso de algaroba;
- Analisar os parâmetros cinéticos da produção dos biossurfactantes por linhagens de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus* nas condições de processo propostas;
- Promover a recuperação dos biossurfactantes produzidos por linhagens *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus*;
- Avaliar a capacidade de emulsificação dos biossurfactantes produzidos em compostos hidrofóbicos (óleo de motor, óleo vegetal e querosene);
- Avaliar a estabilidade da emulsificação do biossurfactante produzido quanto à influência da temperatura, salinidade e pH;
- Caracterizar estruturalmente os biossurfactantes produzidos por linhagens *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Surfactantes são moléculas anfipáticas com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos em sua estrutura, permitindo uma variedade de mudanças em sistemas heterogêneos. Apresenta uma porção apolar, que geralmente contém cadeia de hidrocarbonetos, enquanto uma unidade polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica, ou anfotérica (MAO et al., 2015). Por causa dessas propriedades, estes compostos tendem a se concentrar na região interfacial de fluidos imiscíveis, reduzindo a tensão superficial e tensão interfacial e, como resultado, aumento da solubilidade e mobilidade de moléculas hidrofóbicas ou compostos orgânicos insolúveis. Devido à sua alta atividade de tensoativa, essas moléculas apresentam características como detergente, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante e umectante, solubilidade e separação de fases. (SINGH et al., 2007).

A eficiência de um surfactante é determinada pela capacidade de redução da tensão superficial, que se mede de acordo com a energia livre da superfície pela unidade de área, necessária para mover moléculas interinas para a superfície. Um bom surfactante age reduzindo aproximadamente a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial entre água e n-hexadecano de 40 para 1mN/m, esses são alguns parâmetros que podem ser seguidos para caracterizar o tensoativo. A tensão superficial relaciona-se com a concentração dos compostos tensoativos até o momento em que a concentração micelar crítica (CMC) é alcançada. A CMC define-se como a solubilidade de um tensoativo na fase aquosa, ou seja, a concentração mínima de tensoativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial. Na prática, a CMC é também a concentração máxima dos monômeros de surfactante em água influenciada diretamente pelo pH, temperatura e força iônica (MULLIGAN, 2004).

A grande parte dos surfactantes é sintetizada a partir de derivados de petróleo e é amplamente utilizada em diversos setores industriais. No entanto, esses surfactantes sintéticos são tóxicos e não biodegradáveis, o que justifica a busca por meios alternativos menos prejudiciais ao ambiente (VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015).

Diversos compostos que possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial são produzidos por organismos vivos, abrangendo plantas, microrganismos e até mesmo o corpo humano. Esses compostos são conhecidos como surfactantes naturais. Recentemente, houve

um aumento no interesse por surfactantes de origem microbiana, uma vez que possuem características sustentáveis que diminuem o impacto no meio ambiente e ampliam suas possíveis aplicações, como por exemplo, em processos de biorremediação (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

Vários biossurfactantes, atualmente conhecidos, são classificados com base em suas estruturas químicas e origem microbiana. As principais classes de biossurfactantes incluem-se: glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios, lipídios neutros e ácidos graxos, biossurfactantes poliméricos, e surfactantes particulados (MAIER, 2003).

Os biossurfactantes podem ser obtidos através de processos relativamente simples, como a fermentação, podendo ter uma variedade de estruturas químicas. Geralmente, a produção de biossurfactantes pode ser estimulada por processos de indução ao microrganismo, por exemplo, colocar em meio de cultura compostos hidrofóbicos como óleos, para induzir a síntese de biossurfactantes pelo microrganismo. Todavia, existem biossurfactantes de diversas origens microbianas: fungos, leveduras e, principalmente bactérias, que possui uma variedade de espécies e diversos gêneros (BANAT et al., 2000).

As características dos biossurfactantes estão ligadas aos microrganismos produtores. Assim, suas estruturas e isoformas dependem da origem microbiana, definindo suas funções e aplicações. Vários fatores influenciam a produção biossurfactante, o que inclui o pH, a temperatura, a agitação e o modo de operação, a natureza de fontes de carbono e nitrogênio, e a presença de ferro, fósforo, manganês e magnésio. O controle desses fatores favorece a quantidade, rendimento e qualidade dos biossurfactantes produzidos. No entanto, devido ao alto custo de produção, recuperação e purificação, a utilização desses compostos representam um desafio para sua aplicação industrial. Ao que diz respeito ao "alto custo", refere-se as matérias-primas, que por vezes podem ter um baixo rendimento na produção, além dos processos de recuperação e purificação (SECATO et al., 2016).

Apesar de várias de aplicações, os biossurfactantes microbianos ainda não são usados em escala industrial, devido ao custo de substrato e dos processos de recuperação e purificação. Todavia, pesquisas adicionais são necessárias de modo a contornar e minimizar o custo final de produção, para tornar o produto mais rentável, potencializando o interesse da indústria e a viabilidade econômica (KIRAN et al., 2010).

3.1.1 Categorização dos biossurfactantes

Biossurfactantes são agrupados com base na sua composição química e na fonte microbiana, formando uma das principais categorias de agentes de superfície naturais. Seguindo essa classificação, as categorias principais compreendem os glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. A tabela 3.1 apresenta os biossurfactantes organizados de acordo com essa classificação. Em contrapartida, surfactantes sintéticos são classificados de acordo com seu grupo polar, como previamente descrito (NITSCHKE et al., 2004)

Tabela 3.1 – Categorização dos biossurfactantes e seus microrganismos produtores

Continua	
TIPO DE BIOSSURFACTANTE	MICRORGANISMO
Glicolipídios	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e Lipoproteínas	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos Graxos, Lipídios Neutros e	
Fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus tiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Tabela 3.1 – Categorização dos biossurfactantes e seus microrganismos produtores

	Conclusão
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes Particulados	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: Adaptado de Desai e Banat, 1997.

A variedade de biossurfactantes de origem microbiana está associada à capacidade única de cada microrganismo para sintetizar tensoativos biológicos distintos, cada um com características específicas. A quantidade e a qualidade desses tensoativos biológicos variam dependendo do microrganismo produtor, da disponibilidade de substrato para seu crescimento, bem como da concentração de íons, como nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio de cultivo. Além disso, as condições operacionais da cultura, como pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição, desempenham um papel crucial nesse processo (BANAT, 2000).

A classificação dos biossurfactantes também pode estar associada ao seu tamanho molecular. Geralmente, os biossurfactantes de baixo peso molecular tendem a ser glicolipídeos ou lipopeptídeos, demonstrando maior eficácia na redução da tensão superficial e interfacial. Em contraste, os biossurfactantes de alto peso molecular incluem polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas anfipáticas, e são conhecidos por serem eficazes estabilizadores de emulsões de óleo e água (VAN HAMME et al., 2006).

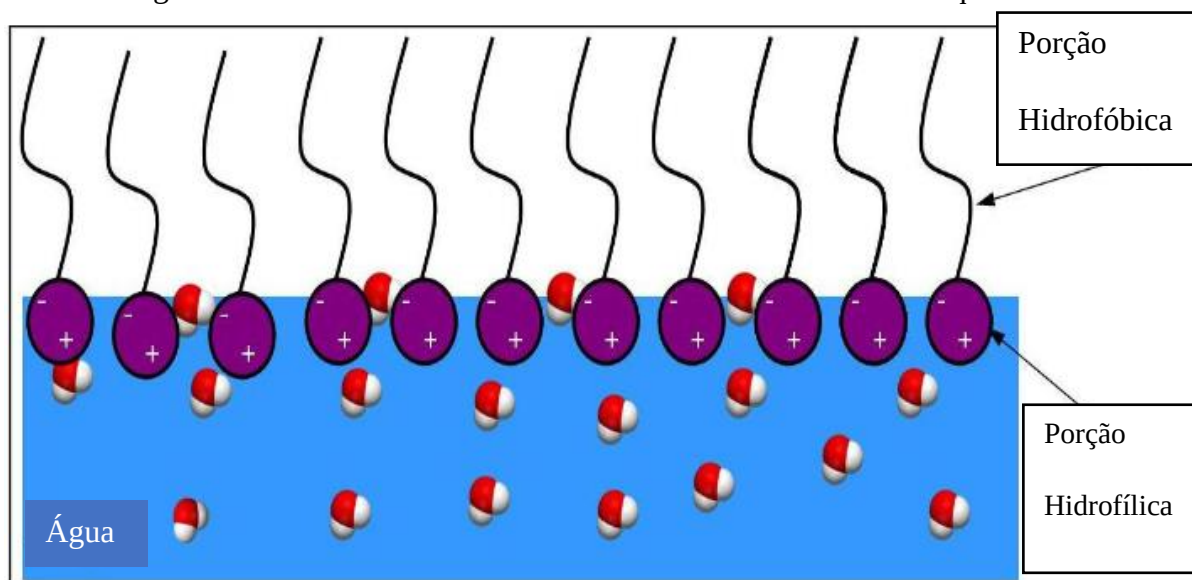
3.1.2 Características dos biossurfactantes

As propriedades dos surfactantes, e, por conseguinte, suas aplicações práticas em diversos setores industriais, como detergentes, recuperação de petróleo, cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos, agricultura e mineração, são influenciadas pela localização e pelo tamanho dos grupos funcionais hidrofílicos e hidrofóbicos em suas moléculas (DESAI e BANAT, 1997).

Os biossurfactantes contêm diversas aplicabilidades, nas quais pode mencionar as seguintes:

a) Atividade emulsificante: graças à sua natureza anfifílica, os biossurfactantes têm a habilidade de criar emulsões e mantê-las estáveis (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Biossurfactantes se acumulando na interface entre líquidos e ar



Fonte: Adaptado de Santos, Sailva, & Costa. (2016)

Uma emulsão pode ser descrita como um sistema heterogêneo no qual, pelo menos, uma fase imiscível ou parcialmente miscível está dispersa na forma de pequenas gotículas, com tamanhos que variam de 1 a 10 micrômetros, dentro de outra fase contínua (MULLIGAN, 2005).

Essa característica é de extrema importância quando se trata do processo de decomposição de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos e no solo, uma vez que ela amplia a superfície de contato entre substâncias hidrofóbicas. Isso, por sua vez, facilita a degradação de poluentes por microrganismos. Apesar de não serem particularmente eficazes na redução da tensão superficial, os biossurfactantes de alto peso molecular são comumente relacionados à criação de emulsões estáveis (ROSENBERG & RON, 1999).

a) Atividade tensoativa: a característica mais significativa de um surfactante é a sua capacidade de influenciar as tensões superficiais e interfaciais. As moléculas nas gotículas de água permanecem unidas devido às forças intermoleculares, incluindo as ligações de hidrogênio.

A força gerada pelas ligações de hidrogênio forma uma resistência na superfície, conhecida como tensão superficial. Como exemplo, a água destilada tem uma tensão superficial

de 72 mN/m, e quando um surfactante é introduzido na água, essa tensão superficial diminui. A surfactina, produzida por *Bacillus* sp., tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m (Cooper e Goldenberg, 1987).

b) Tolerância a pH, temperatura e força iônica: alguns biossurfactantes exibem uma notável resistência a variações de temperatura e pH, tornando-os adequados para aplicações em ambientes com condições severas. Os biossurfactantes mantêm sua eficácia em ambientes com concentrações de até 10% de NaCl, enquanto surfactantes convencionais são inativados com concentrações salinas mais baixas, geralmente entre 2-3% (BOGNOLO, 1999).

c) Decomposição biológica: ao contrário dos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são prontamente decompostos na água e no solo, tornando-os adequados para usos como a biorremediação e o tratamento de resíduos (MULLIGAN, 2005).

d) Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm despertado interesse devido à crescente apreensão da sociedade em relação aos efeitos alérgicos provocados por produtos químicos sintéticos. Devido a sua baixa toxicidade, os biossurfactantes também são permitidos em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos (CAMPOS et al., 2013).

e) Ampla composição química, permitindo aplicabilidade sob medida para circunstâncias específicas (CAMPOS et al., 2013).

f) Podem ser produzidos a partir de matérias-primas sustentáveis, ao passo que a maioria dos surfactantes sintéticos é derivada do petróleo sendo tóxico ao meio ambiente. (MAKKAR et al., 2011).

3.2 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

O tamanho e a localização dos grupos funcionais hidrofóbicos e hidrofílicos são o que determinam as propriedades dos biossurfactantes, consequentemente, indicam como estes podem ser aplicados na indústria de detergentes, de alimentos, cosméticos, produtos agrícolas, farmacêuticos e na recuperação avançada de óleo (AL-BAHRY et al., 2013). Além disso, apresentam baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e compatibilidade ambiental. As numerosas vantagens dos biossurfactantes fazem com que suas aplicações sejam recomendadas, não somente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, mas também na proteção ambiental (KITAMOTO et al., 2002; KARANTH et al., 1999; BUGAY, 2009).

Em diversos produtos de limpeza, destacam-se os detergentes para lavagens de roupas, limpezas de superfícies e de higiene pessoal, no qual os biossurfactantes podem ser um

excelente substituto, menos danoso ao meio ambiente tão quanto na remediação de contaminantes orgânicos e inorgânicos (PERFUMO, BANAT, MARCHANT et al., 2018).

Os biossurfactantes também têm potencial significativo e promissor na indústria alimentícia, devido à sua capacidade antiadesiva e habilidade de atuar como agente emulsificante. Isso é crucial em alimentos que contêm óleos e gorduras, pois ajuda na formação de emulsões estáveis, melhorando a textura e a cremosidade dos produtos, semelhante ao papel dos emulsificantes convencionais utilizados atualmente (GIRI et al., 2017).

A biorremediação é uma das técnicas biológicas mais estudadas para remediar ambientes contaminados por hidrocarbonetos, incluindo água oleosa e áreas marinhas afetadas por derramamentos de óleo (OSTENDORF et al. 2019; SANTOS, et al, 2016).

Segundo Santos et al. (2016) biossurfactantes apresentam excelentes estabilidades sob condições extremas de temperatura, pH e de salinidade em aplicações de remediação ambiental.

A escolha da aplicação do biossurfactante será crucial para determinar o processo de *downstream*, o grau de pureza e concentração final após sua produção. A Tabela 2 mostra várias aplicações que os biossurfactantes e os diversos setores de atuação.

Tabela 3.2 – Diversas Aplicações dos biossurfactantes

Continua	
FUNÇÕES	CAMPOS DE 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	Misturas carvão-água, calcáreo-água

Tabela 3.2 – Diversas Aplicações dos biossurfactantes

	Conclusão
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: Adaptado de (NITSCHK e PASTORE, 2002)

3.3 PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Vários anos se passaram desde que a produção de biossurfactantes por microrganismos foi extensivamente estudada e, como resultado, promoveu ampliação dos dados relacionados à produção, tipo e propriedades dos biossurfactantes (MUKHERJEE et al., 2006). Biossurfactantes podem ser obtidos através de processos simples de fermentação, e em sua produção geralmente requer a presença de uma fonte de carbono do tipo hidrofílico e oleoso/hidrocarboneto no meio da cultura (NITSCHKE et al., 2004).

A produção de biossurfactantes, tanto em escala de bancada como em processos industriais, tem sido realizada principalmente por fermentação submersa (FSbm), como é o caso do lipopeptídeo surfactina produzido pela Sigma-Aldrich, empregando *Bacillus subtilis*. Em biorreatores, a produção dos biossurfactantes é ainda mais cara em comparação a produção dos seus equivalentes sintéticos; desse modo, o principal desafio de sua produção a longo prazo é direcionar o meio cultivo de menor custo, o processamento, recuperação e estratégias de purificação (KRIEGER et al., 2009).

Quando produzidos em biorreatores a concentração do biossurfactante no meio de cultura e suas fases de recuperação determinarão a viabilidade da produção em grande escala. Em geral, a baixa concentração obtida e a estrutura química dificultam a extração, particularmente quando substratos complexos são usados no processo de fabricação (HUDAK e CASSIDY, 2004).

Resíduos ou subprodutos da agroindústria, por exemplo, são considerados substratos promissores para processos de fermentação, alguns já reconhecidos, outros são estudados constantemente. Em geral, esses compostos são ricos em carboidratos, lipídios e nitrogênio, essenciais e benéficos para o crescimento de microrganismos (SANTOS, 2007). O uso de resíduos agrícolas em processos de fermentação é uma alternativa para reduzir custos na produção de bioprodutos, e ao mesmo tempo em que aborda as questões de poluição causadas

pelo acúmulo e descarte inadequado desses resíduos no meio ambiente (COSTA, 1996). Embora, seja uma alternativa interessante o uso de subprodutos ou resíduos em processos fermentativos, os processos de *downstream* podem ser mais dificultados devido a composição complexa desses substratos.

3.3.1 *Bacillus Subtilis* e *Bacillus Pumilus*

Bacillus subtilis é uma bactéria aeróbica gram-positiva encontrada no solo, conhecida por suas excelentes características fisiológicas e capacidade de adaptação metabólica, o que permite seu cultivo em substratos de baixo custo (SU et al., 2020). Este microrganismo é amplamente reconhecido por sua capacidade de produzir metabólitos com propriedades tensoativas. Tem habilidade de prosperar tanto em ambientes aeróbicos quanto anaeróbicos, além de ser considerado não patogênico. Essas características tornam possível sua utilização em setores como a indústria alimentícia e farmacêutica, bem como em aplicações relacionadas ao meio ambiente (NEVES et al., 2007). Sendo um organismo que não causa doenças, portanto, é seguro para seres humanos e animais, como consequência seus metabólitos também se tornam seguros.

As biomoléculas geradas pelo metabolismo de *B. subtilis* são amplamente aplicadas na indústria, e essas bactérias podem secretar proteínas funcionais ao meio de cultura. Além disso, há uma vasta quantidade de informações disponíveis sobre sua genética e sobre como desenvolver em grande escala (PHAN et al., 2006).

As cepas de *B. subtilis* são extensivamente empregadas como fontes essenciais de enzimas industriais, biossurfactantes, antibióticos e inseticidas. A capacidade dessas cepas de secretar grandes quantidades de proteínas diretamente no meio de cultivo, juntamente com a facilidade de cultivo e comprovada segurança, também permitiu sua aplicação em larga escala. O desenvolvimento da linhagem ocorre dentro da faixa de temperaturas das bactérias mesófilas, que vai de 25 a 37 °C. Esse crescimento resulta na formação de colônias com características morfológicas notavelmente diferentes, e essa variação é influenciada pelas condições do meio em que o microrganismo está se desenvolvendo (HARWOOD, 1992).

Bacillus pumilus é uma bactéria Gram-positiva que forma esporos e é encontrada naturalmente em diversos ambientes, como água do mar, sedimentos de águas profundas e solo (PUDOVA et al., 2022).

As cepas de *B. pumilus* são altamente resistentes a condições ambientais extremas, como baixa disponibilidade de nutrientes, dessecação, irradiação, H₂O₂ e desinfecções química.

O papel ecológico do *B. pumilus* é enfatizado pelo fato de produzir compostos antagonistas a patógenos fúngicos e bacterianos. Portanto, é de considerável interesse de pesquisa para entender sua diversidade fisiológica, relação genética com outras espécies de *Bacillus* e a possível presença de fatores toxigênicos (PARVATHI et al., 2009).

O aumento das mudanças climáticas e da poluição ambiental está impulsionando o desenvolvimento de fertilizantes sustentáveis. Uma abordagem altamente eficaz para uma fertilização segura parece ser o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal. *Bacillus pumilus* é reconhecida por suas propriedades como uma dessas bactérias promotoras deste crescimento (ČIMO et al., 2020).

A maioria dos biossurfactantes produzidos por esses microrganismos pertence à categoria de lipopeptídeos, que geralmente são constituídos por anéis compostos por oito membros. Destes, sete são compostos por aminoácidos, enquanto o oitavo é um ácido graxo que varia em tamanho e estrutura. Entre esses biossurfactantes, podemos mencionar os lipopeptídeos cíclicos, como as surfactinas, e o grupo das iturinas, que inclui as bacilomicinas e a micosubtilisina. Essas substâncias são notáveis devido às suas propriedades antimicrobianas e à capacidade de reduzir a tensão superficial (AHIMOU et al., 2000).

É reconhecida como bactéria promotoras de crescimento vegetal (BPCP), por exemplo, devido à sua capacidade de crescer em simbiose com as raízes das plantas. Essa interação com substratos beneficia o crescimento das plantas ao competir com outros microrganismos, ativar suas defesas contra patógenos e aumentar a disponibilidade de nutrientes essenciais, como fósforo e nitrogênio (EARL et al., 2008).

3.3.2 Algaroba

A algaroba ou algarobeira (*Prosopis juliflora* (Sw) D.C.) é uma planta tropical de origem africana que faz parte da família *Fabaceae*. Ela é amplamente encontrada no Nordeste do Brasil e, em menor quantidade, em outras regiões do país. Devido à sua resistência e capacidade de adaptação, a algaroba tem se destacado como uma alternativa significativa para a alimentação tanto de seres humanos quanto de animais durante períodos prolongados de seca nas regiões mais áridas do Brasil (PEREIRA et al., 2018).

Com o apoio do Ministério da Agricultura, a algaroba começou a se dispersar para os estados do Piauí, Ceará e Paraíba a partir de 1951, graças ao fornecimento de sementes e mudas para agricultores, profissionais e municípios, a fim de acelerar o seu desenvolvimento. No

período entre 1979 e 1984, várias instituições, como a Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste (SUDENE), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e as Empresas de Assistência Técnica e Extensão Rural dos Estados (EMATER's), realizaram campanhas para promover o plantio de algarobas no Nordeste. Estima-se que tenham sido estabelecidos cerca de 90 mil hectares de *Prosopis juliflora* (Sw). D.C., com uma presença significativa nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (REIS, 1985). Atualmente, acredita-se que a área ocupada pela espécie esteja próxima a um milhão de hectares, mas não existem levantamentos precisos que tenham mensurado a real extensão dessa ocupação (DOS SANTOS, 2015).

A algarobeira tem uma ampla aplicação: suas folhas e sementes são aproveitadas como fontes de suplementação alimentar devido ao seu alto valor nutricional. As vagens de algaroba são altamente promissoras como aditivos em silos de capim, graças ao seu elevado teor de glicose, que varia entre 25 e 28%, proteínas que vão de 11 a 17% e ácidos orgânicos que oscilam entre 14 e 20%. Elas também contêm pectinas e outras substâncias, tornando-as uma fonte nutritiva excelente (DIAS, 2017). Sua madeira, de grande resistência, pode ser utilizada na construção e na produção de carvão vegetal, enquanto as folhas e o tronco podem fornecer substâncias úteis para as indústrias alimentícia e de bebidas. Além disso, a algaroba é altamente promissora para atividades de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, devido à sua natureza leguminosa, que possibilita a associação com bactérias do gênero *Rizobium*. Essa planta é considerada robusta e adaptável, mesmo em ambientes desafiadores (PASIECZNIK et al., 2001).

A produção de vagens de algaroba começa a partir do segundo ou terceiro ano da planta e continua sendo economicamente viável até os 30 anos de idade da árvore. Na Região Nordeste, estima-se uma produção média de frutos de cerca de 6 toneladas por hectare por ano para plantas de cinco anos, variando de 2 a 8 toneladas por hectare por ano. Dependendo da zona bioclimática em que as algarobeiras são cultivados e gerenciados, árvores de 15 anos de idade podem apresentar uma produção média superior a 70 kg de vagens por árvore (RIBASKI, 2009).

Figura 3.2 - Vagem da algaroba



Fonte: LBA – UFPB 2016

A falta de um manejo adequado, a adaptação regional da espécie, a facilidade de dispersão promovida pelos rebanhos e outros fatores transformam a algarobeira em uma questão polêmica que gera debates consideráveis, de acordo com alguns pesquisadores (PEGADO et al., 2006). Portanto, uma possível solução para esse impasse seria investigar como agregar valor às vagens de algaroba, explorando o seu potencial de fermentação para o desenvolvimento de produtos com potencial no campo da biotecnologia.

3.4 PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Nos processos biotecnológicos, existem passos principais, que são: *upstream* que corresponde ao preparo e caracterização do substrato a ser utilizado no processo; *central point* ou *process* que ocorre o contato entre os agentes produtores representados pelos microrganismos com o substrato a ser utilizado; e *downstream* onde são realizados os processos de recuperação, purificação e concentração dos bioprodutos. Esta última etapa geralmente é bastante complexa e, na maioria das vezes, os processos dessa etapa não são completos, tornando o produto com custo elevado. Para a maioria dos processos biotecnológicos que utilizam do processo de *downstream*, estes são responsáveis por cerca de 60% dos custos da produção (MANO, 2008).

Os biossurfactantes do tipo surfactina, que são os normalmente produzidos pelo gênero *Bacillus*, são recuperados do meio de cultura por métodos clássicos, como: precipitação (com sulfato de amônio, acetona, ácido), extração com solventes orgânicos e cristalização;

centrifugação, adsorção separação de espuma e precipitação, filtração com escoamento tangencial, diafiltração e ultrafiltração (HOFFMAN et al., 2021).

É preciso uma atenção especial para a extração dos biossurfactantes, pois depende da estrutura e propriedade. Existem muitos métodos efetivos para um tipo de biossurfactante, mas pode-se tornar ineficiente para outros. Em especial, a surfactina primeiro separa as células do sobrenadante, pois são produtos extracelulares. Posteriormente, utiliza-se a precipitação ácida com HCl, em seguida, aplica-se os métodos de extração por solventes, como metanol ou diclorometano (SANTOS, 2001).

Muito aplicada em processos de recuperação de proteínas, a precipitação ácida para recuperação de bioprodutos é uma técnica bem estabelecida. Nos processos de precipitação, a solubilidade é reduzida para a adição de solventes orgânicos, sais ou ácidos. Também utilizada como primeiro passo de purificação para remoção de produtos indesejáveis do bioprocessos, como ácidos nucleicos e outros componentes residuais, a fim de remover compostos indesejáveis antes do processo de alta eficiência (MANO, 2008).

Em geral, biossurfactantes do tipo surfactina e seus equivalentes, como os produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, são obtidos por meio de um processo de precipitação ácida. Por outro lado, os biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, são recuperados utilizando acetona como parte do processo. Em relação a algumas impurezas, elas são extraídas junto com o composto desejado, o que influencia a seleção dos passos subsequentes de extração e cromatografia. Portanto, muitos pesquisadores optam por utilizar métodos mais simples para purificar e concentrar esses lipopeptídeos (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

Uma particularidade notável dos biossurfactantes é a sua capacidade de manter sua estabilidade mesmo quando submetidos a condições extremas de temperatura, variações de pH e níveis de salinidade elevados. Essa característica abre caminho para uma variedade de aplicações tanto na indústria quanto em cenários ambientais. Nesse caso, a surfactina é considerada um dos biossurfactantes mais poderosos e amplamente pesquisados, é principalmente produzida por *Bacillus subtilis*. Ela exibe uma notável capacidade de reduzir a tensão superficial e de formar emulsões, mesmo em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (BEZZA, 2015).

Biossurfactantes na forma de glicolipídeos, produzidos pela *Candida bombicola*, mantiveram sua estabilidade mesmo após 2 h de incubação em uma faixa de pH que variou de 2 a 10 e na presença de até 20% de cloreto de sódio (NaCl). No caso do biossurfactante do tipo lipopeptídeo produzido pela *Streptomyces sp.*, ele demonstrou estabilidade somente em

ambientes alcalinos, com pH na faixa de 8 a 12, e resistiu a temperaturas variando de 30 a 100°C (KHOPADE, 2012).

Essas pesquisas evidenciam que o comportamento dos biossurfactantes varia significativamente de acordo com o tipo. Alguns deles mantêm sua estabilidade em ambientes com valores de pH alcalinos ou ácidos, enquanto outros são mais sensíveis a variações de temperatura e salinidade, o que pode afetar a sua capacidade emulsificante.

3.5 CINÉTICA DE PRODUÇÃO

A análise cinética de um processo de fermentação envolve a observação e avaliação das concentrações dos diversos elementos presentes no sistema de cultivo ao longo do tempo. Esses elementos compreendem o microrganismo em crescimento, os produtos gerados pelo metabolismo e os substratos que constituem o meio de cultura (SCHMIDELL et al., 2001).

Após a introdução do microrganismo no meio de cultura que fornece os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, observa-se um padrão característico nas concentrações celulares ao longo do tempo, o qual é didaticamente dividido em diferentes fases:

Fase 1 - chamada de fase de latência ou fase lag, esta etapa ocorre logo após a introdução do microrganismo no meio de cultivo. Durante esse período de adaptação, o microrganismo produz enzimas essenciais para o metabolismo dos componentes do meio, mas não há aumento na sua população.

Fase 2 - chamada de fase de transição, nessa etapa, ocorre o início da replicação do microrganismo, resultando em um aumento gradual na taxa de crescimento.

Fase 3 - conhecida como fase logarítmica ou exponencial, essa etapa é caracterizada pela manutenção de uma taxa constante e máxima de crescimento, indicando que a velocidade de crescimento está diretamente relacionada à concentração celular.

Fase 4 - é identificada como a fase linear de crescimento, na qual a velocidade de reprodução se mantém constante.

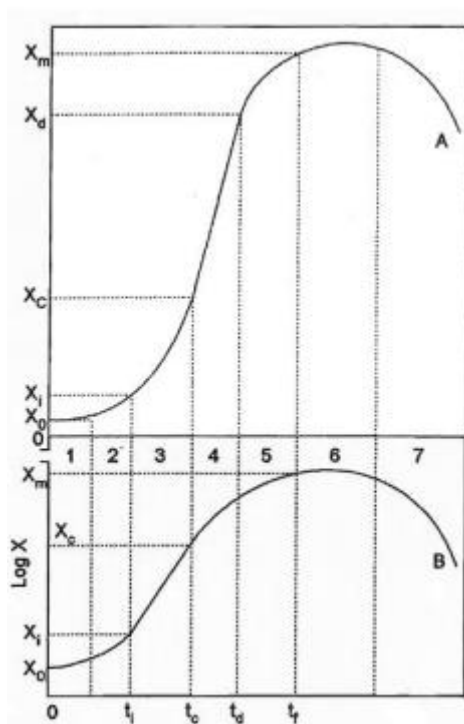
Fase 5 - é designada como a fase de desaceleração, na qual a velocidade de crescimento diminui devido ao esgotamento dos recursos no meio de cultura, bem como ao acúmulo de inibidores e produtos metabólicos.

Fase 6 - é chamada de fase estacionária, na qual há um equilíbrio entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do microrganismo. Em outras palavras, o número de células que se reproduz é igual ao número de células que morre.

Fase 7 - conhecida como fase de declínio, essa etapa é marcada pela redução na concentração celular devido à velocidade de morte que supera a velocidade de produção de novas células.

A Figura 3.3 ilustra de forma linear e semilogarítmica as etapas de crescimento dos microrganismos conforme definidas por Schmidell et. al. (2001).

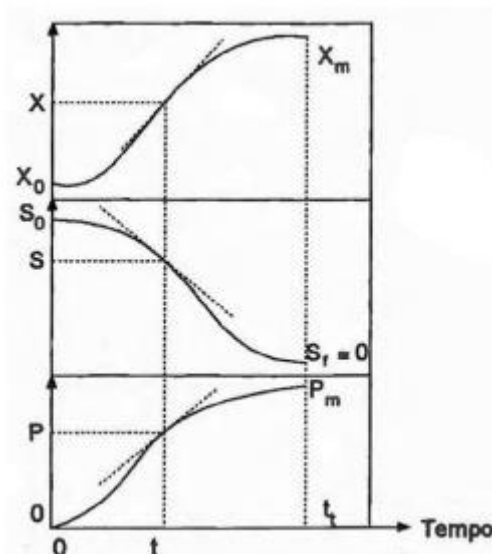
Figura 3.3 - Curva de crescimento do microrganismo, a parte superior “A” é representada em ordenadas lineares e na parte inferior “B” a representação semilogarítmica.



Fonte: Adaptado de Schmidell et. al. (2001).

Em processos fermentativos, são analisadas as variações nas concentrações de crescimento celular (X), produtos gerados (metabólitos) (P) e substratos presentes no meio de cultura (S) ao longo do tempo (t) (Figura 3.4). A cinética permite a comparação de diferentes métodos de cultivo, e por meio desse estudo, é possível determinar as condições ideais de cultivo, como pH, temperatura, velocidade de agitação e taxa de aeração (SCHMIDELL et al., 2001).

Figura 3.4 – Curvas da variação das concentrações dos componentes de uma fermentação, onde X, P e S são as concentrações de microrganismo, do produto e do substrato residual no meio, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Schmidell et. al. (2001).

É possível realizar uma comparação quantitativa das diferentes condições de cultivo por meio da diferença entre as concentrações iniciais e finais, referidas como dx , dp e ds . Ao dividir esses valores pelo intervalo de tempo (dt , tendendo a zero), obtemos as velocidades instantâneas de transformação, representadas pela Equação 3.1. Os autores denominam r_x , r_s e r_p como a produtividade de produção de biomassa, consumo de substrato e produção de produto, respectivamente (SCHMIDELL et al., 2001).

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad r_S = -\frac{dS}{dt} \quad r_P = \frac{dP}{dt} \quad (3.1)$$

No decorrer de um processo de fermentação, a concentração celular aumenta. Nesse contexto, é viável calcular a velocidade específica de crescimento (μ_x), como definido por Schmidell et al. (2001), usando a Equação 3.2:

$$\mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3.2)$$

Durante a fase de crescimento exponencial dos microrganismos, a velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) atinge seu valor máximo e se mantém constante. O $\mu_{\text{máx}}$ pode ser calculado através da linearização dos valores de concentração celular ao longo da fase exponencial. Além disso, é possível estimar o tempo de geração da linhagem durante o cultivo utilizando a Equação 3.3. O tempo de geração é o período necessário para que a concentração celular inicial dobre, considerando a taxa de crescimento específica máxima (SCHMIDELL et al., 2001).

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3.3)$$

A produtividade em células é uma medida específica que avalia o desempenho de um processo de fermentação. Ela é definida pela Equação 3.4, e indica que a produtividade representa a taxa média de crescimento até o final do período de fermentação, t_f (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P_x = \frac{X_{\text{máx}} - X_0}{t_f} \quad (3.4)$$

Além disso, é possível quantificar o rendimento do processo, que é obtido através do estudo do crescimento microbiano e da produção de metabólitos. Esses resultados fornecem informações para determinar os fatores de conversão de substrato em microrganismos ($Y_{x/s}$) e de substrato em produto. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), conforme descrito por Schmidell et al. (2001), é expresso na Equação 3.5, onde X e S representam a concentração de biomassa e substrato, respectivamente.

$$Y_{x/s} = - \frac{dX}{dS} \quad (3.5)$$

De maneira simplificada, o fator de conversão substrato-produto, expresso na Equação 3.6, representa a relação entre a quantidade de produto gerado pelo microrganismo a partir do substrato consumido. Isso nos ajuda a entender como eficientemente o substrato é transformado em produto durante o processo (SCHMIDELL et al., 2001).

$$Y_{p/s} = - \frac{dP}{dS} \quad (3.6)$$

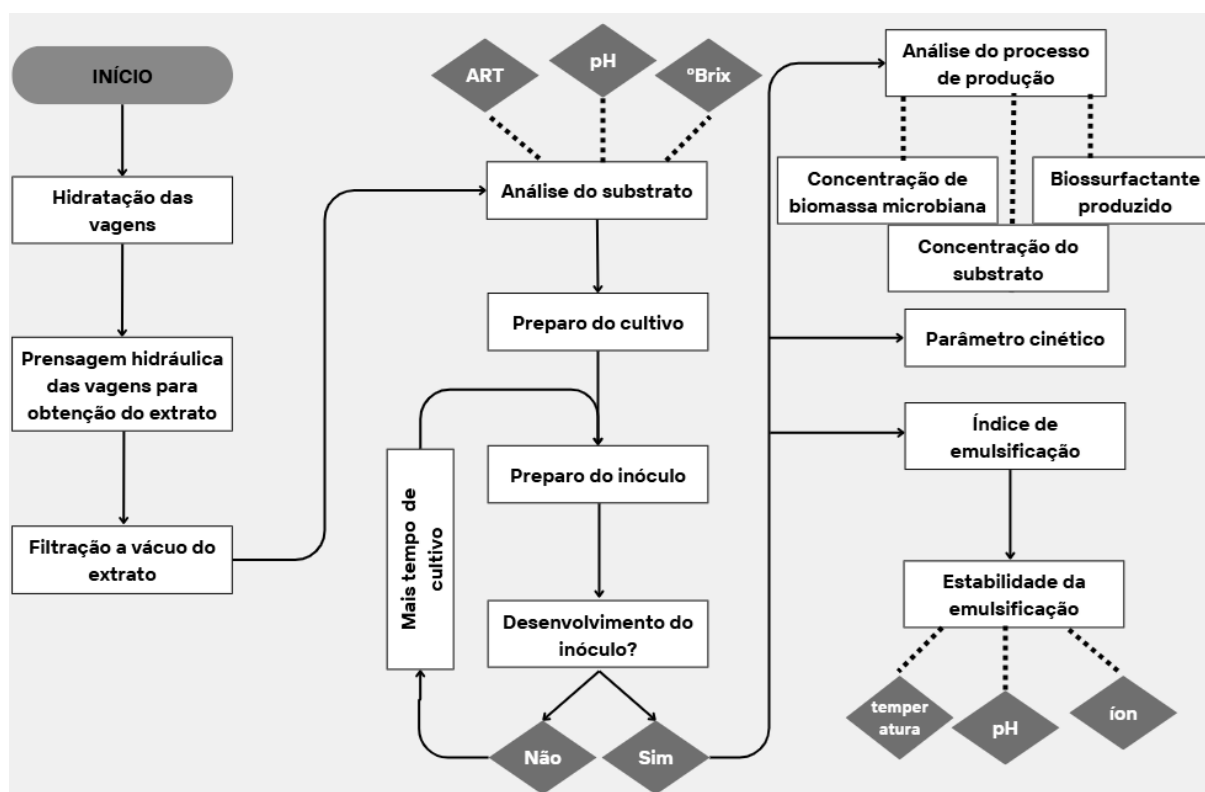
4 METODOLOGIA

Os experimentos para produção de biossurfactantes e avaliação da recuperação e caracterização foram realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.1 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES

Na Figura 4.1 está representando o fluxograma com a descrição de todas as atividades realizadas.

Figura 4.1 - Fluxograma das atividades



Fonte: Autor (2024).

4.2 SUBSTRATO

4.1.1 Extrato da algaroba

O substrato empregado neste estudo para a elaboração dos meios de cultura usados nos testes de fermentação submersa foi o resultado da extração da parte aquosa das vagens da algaroba conforme metodologia descrita por Silva (2009). As vagens utilizadas para obtenção do extrato de algaroba foram provenientes da cidade Japi–RN, coletadas no período de setembro a novembro de 2019. Posteriormente, o extrato obtido foi acondicionado em garrafas plásticas sanitizadas com hipoclorito de sódio a 1,0% (v/v) e armazenado em temperatura de freezer a -20°C.

Inicialmente, as vagens de algaroba foram cuidadosamente selecionadas, descartando aquelas que estavam danificadas, atacadas por insetos, roedores, fungos ou apresentavam sinais de doenças. Além disso, materiais sólidos, como pedras e galhos, foram removidos.

Para a higienização, as vagens foram submetidas a um processo de sanitização com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por aproximadamente 5 min. Após este período, foram enxaguadas com água potável para remoção do excesso da solução sanitizante.

A fragmentação foi realizada com a quebra das vagens em fragmentos de aproximadamente de $1,5 \pm 0,5$ cm com objetivo de aumentar a área de contato entre o solvente e o soluto. Após a fragmentação das vagens, elas foram submetidas a um processo de hidratação com água potável, na proporção de 1 parte de vagens para 2 partes de água, a uma temperatura de 80 °C por cerca de 4 h.

A extração foi realizada utilizando os fragmentos hidratados, que passaram por um processo de prensagem em uma prensa-hidráulica manual, aplicando uma pressão de 10 kgf/cm². Esse procedimento permitiu a obtenção e separação do extrato aquoso do resíduo sólido.

Por último, foi efetuada uma filtração sob vácuo utilizando um funil de Büchner e papel filtro qualitativo, com o objetivo de separar quaisquer particulados que estivessem presentes no extrato.

4.1.2 Caracterização físico-química

Foram realizadas análises físico-químicas no extrato da algaroba, incluindo a determinação do teor de açúcares redutores totais (ART), teor de sólidos solúveis (°Brix) e a medição do pH.

4.1.2.1 Teor de açúcares redutores totais (ART)

Para a determinação dos açúcares redutores totais (ART) conforme metodologia de Vasconcelos et al. (2013), foi realizada uma hidrólise ácida do extrato da algaroba. Isso envolveu a adição de 1 mL do extrato diluído a 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl - 2M) em um balão volumétrico de 50 mL. O conteúdo do balão foi transferido em tubos para aquecer em banho termostatizado a 70 °C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH - 4M) e o volume do balão foi completado com água destilada.

Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL do extrato hidrolisado e 0,5 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em tubos de ensaio. Os tubos foram submetidos a um banho termostatizado (banho maria) a 100 °C por 5 min. Após o período no banho, os tubos foram transferidos para um banho de gelo e mantidos por 5 min. Em seguida, 4 mL de água destilada foram adicionados à amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Como controle, o branco consistiu em 0,5 mL de água destilada em vez da amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata, e a diluição foi considerada no processo de análise. Os valores foram expressos em g/L.

4.1.2.2 pH e Teor de sólidos solúveis (°Brix)

O pH do extrato da algaroba foi medido utilizando um potenciômetro digital devidamente calibrado com soluções padrões de pH 4 e pH 7. O ° Brix do extrato foi medido com o uso de um refratômetro de bancada modelo Biobrix.

4.1.3 Preparo do meio de cultivo

O meio de cultivo para produção de biossurfactantes foi utilizado o extrato de algaroba com 21°Brix e o pH ajustado a 6,8.

Foi realizado cultivo em incubadora rotativa orbital, empregando um frasco Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultura composto pelo extrato de algaroba, com uma concentração de 1% (v/v) de açúcares redutores totais. Esse frasco foi devidamente esterilizado previamente em uma autoclave a 121°C por 15 min.

4.2 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados para produção de biossurfactantes são do gênero *Bacillus*: *Bacillus subtilis* (UFPEDA86) gentilmente cedido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco e *Bacillus pumilus* isolado de solo de descanso de plantação de cana-de-açúcar, originário da Usina Japungu, e gentilmente cedida pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

As linhagens *B. subtilis* (UFPEDA86) e *B. pumilus* foram mantidas em meio ágar Lúria-Bertani (Tryptona 10g/L; Extrato de levedura 5g/L e Ágar 5g/L) em tubos inclinados com 3 mL de meio (pH 6,8). A renovação das células foi realizada periodicamente e incubada a 37°C, durante 24 h e, em seguida, armazenadas a 4°C para sua conservação.

4.2.1 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir do extrato de algaroba a 1% (v/v) com volume total de 100 mL em frasco Erlenmeyer de 250 mL (razão de aeração de 40%). O crescimento microbiano foi acompanhado por turbidimetria em espectrofotômetro a 600nm. Após atingirem a concentração ideal para o processo, verificada pela absorbância (turbidez) do meio entre 0,6 e 0,8 (EVEN, espectrofotômetro), uma alíquota de 10% (v/v) foi transferida para o frasco de cultivo (SCHMIDELL, 2001).

A transferência do inóculo foi realizada em câmara de fluxo laminar a garantir a propagação apenas da linhagem de interesse.

4.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Os cultivos para produção de biossurfactante a partir do extrato da algaroba foram realizados em incubadora rotativa orbital (SOLAB – SL223), utilizando 10 Erlenmeyer de 250 mL, com volume de 100 mL de meio de cultivo (extrato de algaroba a 1%(v/v)) e adicionados 10% (v/v) de inóculo (*B. subtilis* ou *B. pumilus*), conforme ilustrado na Figura 4.2. Durante esses cultivos, foram realizadas análises para avaliar o crescimento microbiano, a concentração do substrato e a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido.

Figura 4.2 – Preparação para produção de biossurfactantes



Fonte: Autor (2023)

Os frascos foram colocados em incubadora rotativa orbital a 37 °C e 200 rpm de agitação, durante 96 h. As amostras foram retiradas em tempos regulares (0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 e 96 h) para as análises e o acompanhamento cinético da produção (Figura 4.3).

Figura 4.3- Incubadora rotativa orbital contendo as amostras em frascos Erlenmeyer



Fonte: Autor (2023).

4.3.1 Análises do processo de produção de biossurfactantes

Os processos fermentativos foram analisados quanto à concentração de biomassa, concentração de substrato e produção do biossurfactante, para posterior determinação dos parâmetros cinéticos.

4.3.1.1 Determinação da concentração de biomassa microbiana

O crescimento microbiano foi acompanhado pelo método turbidimétrico (600nm) e método gravimétrico por peso seco.

Para o método turbidimétrico, uma alíquota de 4 mL do caldo fermentado foi inserida em cubetas de vidro para leitura em espectrofotômetro a 600nm. A turbidez gerada pelo crescimento microbiano foi determinada pela absorbância lida e comparada com o branco analítico, sendo o meio de cultivo livre de células.

O peso seco foi determinado por retirada de uma alíquota de 2mL de caldo fermentado e adicionado a um microtubo previamente pesado. Após, a amostra foi centrifugada (3500 rpm por 10 min em centrífuga MiniSpin – Eppendorf) e, ao final da centrifugação, descartou o sobrenadante e o pellet sedimentado foi levado a estufa a 105°C por 24 h. Em seguida, o pellet livre de umidade foi pesado. Todo o procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco foi determinado de acordo com a Equação (4.1).

$$\text{Peso seco} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{m_{\text{após estufa}} - m_{\text{microtubo}}}{v} \quad (4.1)$$

Em que:

$m_{\text{após estufa}}$ - massa do conjunto células e microtubo após secagem

$m_{\text{microtubo}}$ — massa do microtubo seco

4.3.1.2 Determinação da concentração de substrato

A quantificação do substrato foi realizada pela análise do caldo fermentado isento de células utilizando a metodologia do reagente DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). Para determinação dos açúcares redutores totais utilizou-se o método DNS descrito por Vasconcelos et al. (2013). Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Para determinar a concentração dos açúcares redutores totais foi realizada a hidrólise da amostra, uma vez que o extrato de algaroba é rico em sacarose. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi adicionada a 0,5 mL de ácido clorídrico em um balão volumétrico de 50 mL. O conjunto foi levado a banho-maria (SevenLabor) por 10 min sobre a temperatura de 70 °C. Em seguida, foram adicionados 2 mL de NaOH (4N) e água destilada até completar o volume do balão. Em seguida, uma alíquota de 0,5mL da amostra hidrolisada foi adicionada a 0,5mL do reagente DNS em tubo de ensaio. A amostra foi levada a banho-maria (SevenLabor) a 100 °C por 15 min. Após aquecimento, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 min. Por último, adicionou 4 mL de água destilada a amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. O branco analítico foi composto de 0,5 mL de água destilada ao invés da amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata. A curva padrão foi construída com solução de glicose a 1g/L, com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração.

4.3.1.3 Quantificação do biossurfactante produzido

Para a obtenção da curva de concentração de biossurfactante, foi realizado uma adaptação do método do peso seco, em que foi adicionado 10 mL de meio de cultivo livre de células a um tubo de centrífuga (15mL), previamente pesado. Após, foi realizada a precipitação ácida com HCl (6N) até pH 2, e mantida overnight (12h) a 4 °C (YIN, 2009). Após esse período, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm, 4°C por 15 min. O sobrenadante foi desprezado. O

precipitado foi levado a estufa a 80 °C por 24 h. Em seguida, o *pellet* livre de umidade foi pesado. A quantificação do biossurfactante foi determinada de acordo com a Equação 4.1.

4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os valores cinéticos examinados incluíram a taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$), a produtividade em células (P_x), o tempo necessário para a duplicação (t_g), a eficiência de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e a eficiência de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$). Esses parâmetros foram determinados com base nas Equações (3.4), (3.5) e (3.6) mencionadas anteriormente.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERFÍCIE DO BIOSSURFACTANTE

4.5.1. Índice de emulsificação

A capacidade de emulsificação do biossurfactante foi determinada como descrito pela metodologia dada por Cooper e Goldenberg (1987). Utilizou três tubos graduados, com três tipos de compostos hidrofóbicos, que foram: óleo de motor, óleo vegetal e querosene adicionados ao sobrenadante do cultivo, em proporção 3:2. A análise consistiu em misturar 2mL do sobrenadante obtidos do processo a 3mL de óleo vegetal, 3 mL de óleo de motor e 3 mL de querosene, separadamente em tubos de ensaio de 10mL. Os tubos foram agitados em vórtex por 2 min e deixados em repouso por 24 h, 72 h e 240 h (Figura 4.4). Após os períodos, o índice de emulsificação será calculado em porcentagem, conforme Equação 4.2.

$$IE(\%) = \frac{H_{\text{emulsificada}}}{H_{\text{total}}} \times 100 \quad (4.2)$$

Em que:

IE – Índice de emulsificação dado em porcentagem;

$H_{\text{emulsificação}}$ – altura da camada emulsificada;

H_{total} – altura total.

4.5.1.1 Estudo da estabilidade da emulsificação

A estabilidade dos biossurfactantes foi avaliada frente as variações de temperatura, pH e força iônica, conforme metodologia descrita por Dias (2019). Após a exposição das amostras as diferentes condições, o índice de emulsificação foi determinado em 24, 72 e 240 h.

4.5.1.1.1 Estabilidade térmica

Para avaliar a resistência a variações de temperatura, o meio de cultura isento de células foi distribuído em vários tubos de ensaio e exposto a temperaturas de 40°C, 80°C e 100°C por 30 min em banho-maria, além de 121°C por 30 min em autoclave. Após o tratamento térmico, cada solução foi resfriada até atingir a temperatura ambiente.

4.5.1.1.2 Estabilidade frente ao pH

As amostras do meio de cultivo livre de células foram colocadas em uma série de tubos e tiveram seus pHs ajustados para 2, 4, 6, 8 e 10 com um tempo de exposição de 30 min.

4.5.1.1.3 Estabilidade frente a força iônica

As soluções aquosas de NaCl (p/v) foram preparadas em diferentes concentrações 0%, 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10%. Estas soluções foram adicionadas a amostra (1:1) com um tempo de exposição de 30 min.

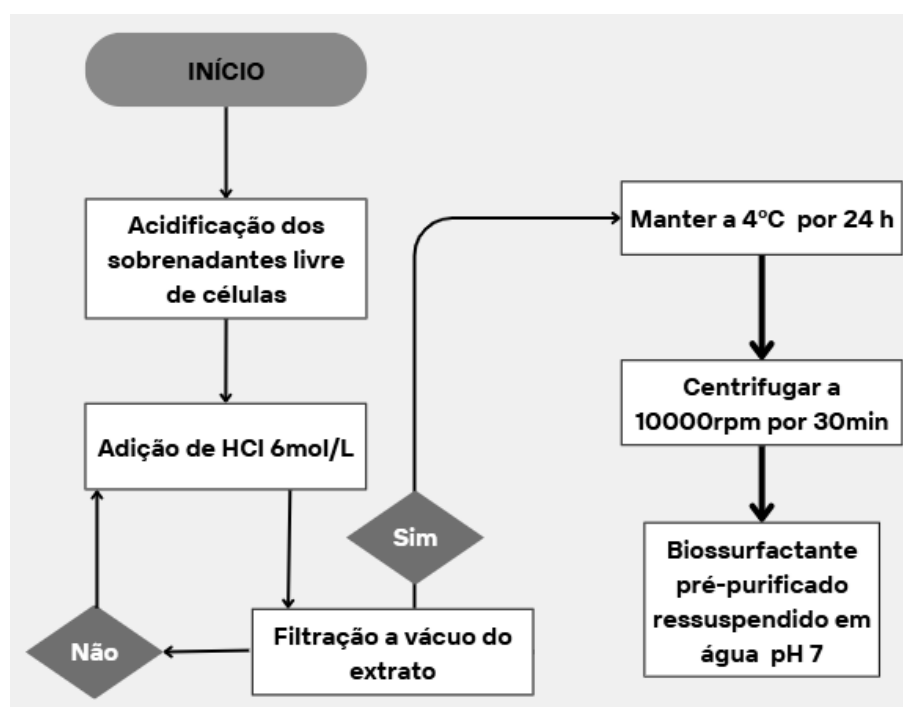
4.6 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

4.6.1 Precipitação ácida para recuperação do bioproduto

O pH dos sobrenadantes dos processos de produção de biossurfactantes por *B. subtilis* e *B. pumillus* foram ajustados para 2,0, utilizando HCl 2 mol/L. O processo de acidificação foi realizado utilizando 85 mL de sobrenadante do *B. subtilis* e 68 mL para o *B. pumillus* para cada frasco de produção.

O sobrenadante acidificado foi mantido a temperatura 4° C por 24h. O precipitado foi separado por centrifugação a 10.000 rpm por 30 min. O pellet foi ressuspenso em 10 mL de água destilada com pH ajustado a 7,0, com solução de NaOH 1 mol/L (GHOJAVAND et al., 2008). O processo está descrito na Figura 4.5.

Figura 4.5 - Fluxograma do processo de recuperação (precipitação ácida)



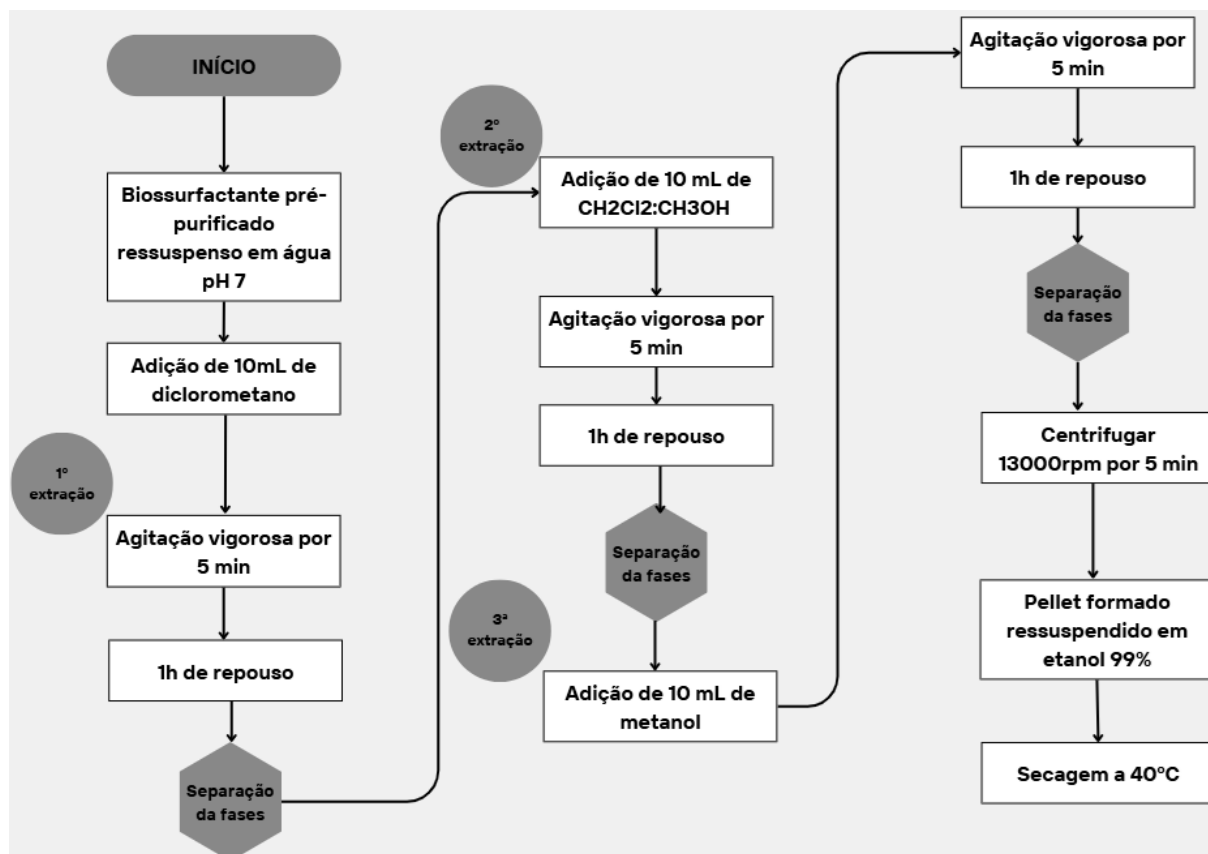
Fonte: Autor (2024)

4.6.2 Extração líquido-líquido para recuperação do bioproduto

A solução resultante da precipitação ácida foi submetida à extração líquido-líquido. Inicialmente foi realizado a extração com diclorometano (CH_2Cl_2) na proporção (1:1), uma segunda extração foi submetida dessa vez utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) e por fim uma terceira extração com metanol na mesma proporção. O solvente recuperado com biossurfactante foi separado por centrifugação a 13.000 rpm por 5 min (MiniSpin, Eppendorf) e ressuspenso

em etanol, evaporado a 40°C em estufa, obtendo-se a fração residual, denominada extrato bruto. Processo realizado conforme a Figura 4.6.

Figura 4.6 - Fluxograma do processo de recuperação (extração líquido-líquido)



Fonte: Autor (2024)

4.6.4 Caracterização do biossurfactante produzido

A caracterização dos biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumillus* foi realizada utilizando a técnica de Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 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 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

O cultivo foi avaliado em relação à concentração de biomassa microbiana (*Bacillus subtilis* 86 e *Bacillus pumilus*), concentração de substrato (extrato de algaroba) e formação de produto (biossurfactante). Para tanto, foram realizados experimentos, em triplicata, com cada uma das linhagens de estudo nas condições de processo indicadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Parâmetros de processo, em incubadora rotativa orbital, para produção de biossurfactantes.

Parâmetros	Valor
Temperatura (°C)	37
Agitação (rpm)	200
Razão de Aeração (%)	40
pH	6,8

Fonte: Autor (2023)

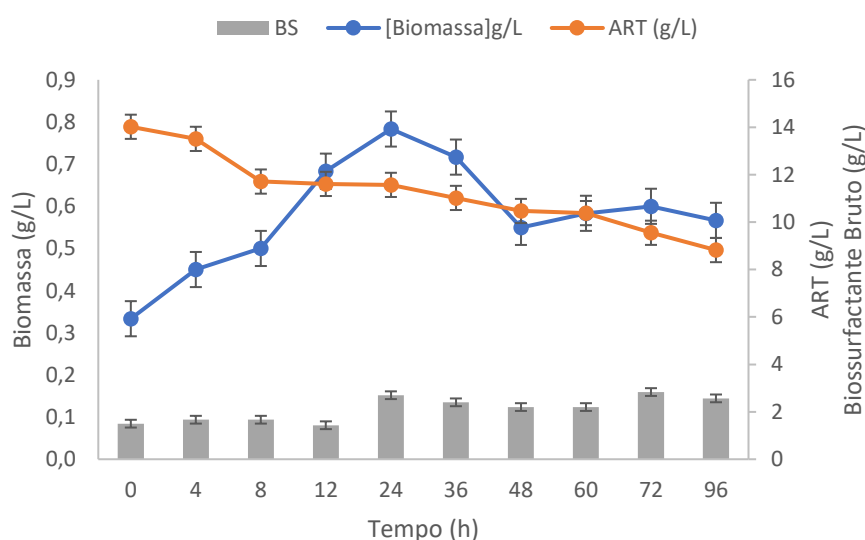
5.1.1. Comportamento cinético com *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*

A Figura 5.1 ilustra o comportamento cinético da linhagem *Bacillus subtilis*, representado pela curva de crescimento, concentração de substrato e concentração de biossurfactante durante 96 h de cultivo. Observa-se que há uma evolução do crescimento microbiano, cuja fase exponencial foi identificada no período de 0 a 24 h de cultivo. A concentração máxima de células foi de 0,78 g/L, após as 24 h. Além disso, nota-se o início da fase estacionária, ocorrendo a diminuição do crescimento da biomassa e, em seguida, ocorreu uma limitação do crescimento, declínio e morte das células. Segundo Heyd et al. (2007), a diminuição na concentração celular pode ser causada pela elevada remoção de células pela espuma que se forma durante o cultivo, as quais acabam sendo capturadas na superfície das

bolhas de gás, ou por falta de nutrientes ao longo do cultivo e até mesmo pelos processos de inibição.

A concentração inicial de substrato foi 14,02 g/L em termos de açúcares redutores totais (ART). A partir das 4 h de cultivo, houve uma baixa redução na concentração de substrato chegando a 11,57 g/L em 24 h. O consumo do substrato coincide com o início do crescimento das células de *B. subtilis* no extrato de algaroba, caracterizando assimilação dos nutrientes presentes no substrato, em particular, a glicose e sacarose disponíveis no meio. Após 96 h de cultivo, é apresentado uma concentração de 8,82 g/L de substrato. Ao final do cultivo, pode-se verificar um consumo de 5,20 g/L de extrato da algaroba.

Figura 5.1 - Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UFPEDA 86



Legenda: BS – Biossurfactante bruto; ART – Açúcar redutor total

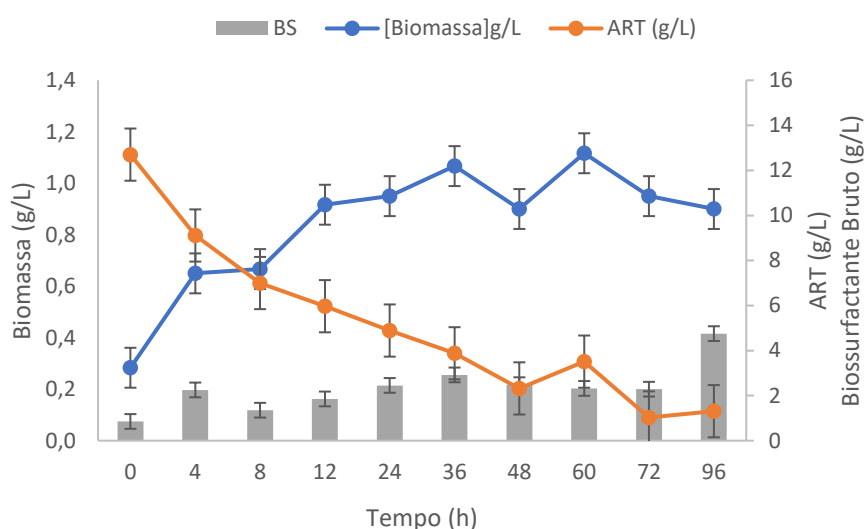
Fonte: Autor (2024)

A concentração de biossurfactante durante o cultivo foi estável, podendo observar um pico nas 24 h de cultivo, 2,70 g/L, e mantendo-se praticamente constante ao longo das 96 h de cultivo. Os resultados obtidos diferem do mencionado no trabalho de Rocha et al. (2017) sobre a produção de biossurfactante pelo *B. subtilis*, indicando que sua produção pode estar ligada ao crescimento microbiano. No presente trabalho, pode-se inferir que a produção de biossurfactante não está associado ao crescimento e, sim, comportando-se como um metabólito secundário.

A Figura 5.2 ilustra o comportamento cinético da linhagem *B. pumilus*, representando a curva de crescimento microbiano, concentração de substrato e concentração de

biossurfactante bruto durante 96 h de cultivo. Observa-se que a crescimento exponencial de 0 a 24 h do processo, com uma concentração máxima de células, $[X_{\max}]$, de 1,07 g/L em 36 h de cultivo, após esse período observa-se um declínio na concentração de biomassa, muito provavelmente pela redução da concentração de substrato naquele momento, devido ao rápido consumo em 24 h de cultivo.

Figura 5.2 - Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus*



Legenda: BS – Biossurfactante bruto; ART – Açúcar redutor total

Fonte: Autor (2024)

A produção de biossurfactante por *B. pumilus* teve uma concentração inicial de substrato de 12,68 g/L e decrescendo em seguida, ocorrendo uma redução gradual ao longo do tempo da concentração do substrato. Ao final do processo, a concentração de substrato consumido foi 11,39 g/L.

A produção de biossurfactante bruto foi de 4,73 g/L em 96 h de cultivo, percebe-se que a concentração de biossurfactante bruto aumenta após a fase exponencial, assim como na linhagem de *B. subtilis*. Embora, o que se relata na literatura, as linhagens do gênero *Bacillus* produtoras de lipopeptídeos, normalmente, sintetizam esses biossurfactantes à medida que crescem no meio de cultivo, portanto, são bioprodutos caracterizados como metabólitos primários, associados ao crescimento microbiano. Vale ressaltar, que no presente estudo teve um comportamento diferenciado, pois a maior concentração de biossurfactante bruto foi observada ao final do processo, após atingir a fase estacionária.

Alguns estudos indicam que níveis elevados de substrato podem impactar o crescimento microbiano. No estudo de Cruz et al. (2018), foi observado que concentrações de 70 e 90 g/L de glicerina, tiveram um efeito adverso no crescimento do *B. subtilis*. Durante o cultivo descontínuo, é frequente notar o fenômeno de inibição pelo substrato ou pelo produto, onde altas concentrações desses componentes podem interferir no metabolismo de crescimento microbiano. É conhecido que a glicerina resultante da reação de transesterificação de triglicerídeos e álcool contém, além de glicerol, diversas impurezas como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual. Yang (2012) observa que a composição química da glicerina varia conforme a eficiência da reação de transesterificação, bem como os tipos de triglicerídeos e impurezas presentes na matéria-prima. Conforme Thompson (2016), a glicerina normalmente contém nutrientes essenciais como fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, os quais podem ser aproveitados pelos microrganismos para promover seu crescimento em processos fermentativos. Janek et. al. (2021) investigaram a produção de surfactina utilizando diversas amostras de glicerina como fonte de carbono, provenientes de diferentes processos como produção de biodiesel, estearina e sabão. Os autores observaram que foram alcançadas diferentes concentrações de surfactina e biomassa, indicando que a composição da glicerina pode ter influenciado nos resultados.

Segundo Andrade et al. (2017) ao investigarem como as impurezas da glicerina derivada da produção de biodiesel afetam a produção de surfactina pelo *B. subtilis* LB2b. Segundo os autores, os cultivos que utilizaram glicerina residual como única fonte de carbono mostraram um crescimento celular significativamente inferior em comparação com os cultivos que usaram glicerina padrão. Adicionalmente, os cultivos que empregaram o resíduo apresentaram uma menor produção de surfactina. O experimento foi conduzido em um meio complexo com 10 g/L de cada substrato testado. Os pesquisadores propõem que essa redução na produção possa estar associada às elevadas concentrações de metanol encontradas na glicerina residual.

Usar glicerina residual diretamente no meio de cultura, sem purificação prévia, oferece uma vantagem significativa em comparação ao uso convencional de glicose como substrato. No entanto, as impurezas presentes na glicerina podem afetar as vias bioquímicas das bactérias, o que limita a eficiência na produção de metabólitos desejados (SAMUL et al. 2014).

Faria (2010) menciona em seu estudo que os biosurfactantes podem ser liberados no meio de cultura tanto durante a fase exponencial quanto estacionária de crescimento. Em relação à cinética de formação de surfactina, alguns pesquisadores relatam que a produção do produto ocorre no final da fase exponencial e no início da fase estacionária de crescimento

(ROCHA et al., 2020; VERDARAN et al., 2011). Cooper et al. (1981) e Kim et al. (1997) afirmaram que a produção de biossurfactante por *B. subtilis* está ligada ao crescimento microbiano, ao passo que Sheppard et al. (1987) sugere que a produção de biossurfactante está parcialmente associada, pois também se observa produção durante a fase estacionária do cultivo.

Diversos pesquisadores destacam que a produção de biossurfactantes ocorre em situações em que o crescimento das células é restrito. Segundo Valpuesta (2008), o desenvolvimento dos microrganismos em condições de nutrientes limitados é crucial para a eficiência do processo de produção de diversos metabólitos secundários, como é o caso da maioria dos biossurfactantes. Neste trabalho, observou-se o aumento da biomassa utilizando *B. subtilis* no decorrer das primeiras 24 h e utilizando *B. pumilus* no decorrer das 36 h, nota-se que a análise das 48 h houve um declínio, podendo ter ocorrido devido algum erro de leitura ou material contaminado.

Na literatura, a produção média de surfactina usando glicerina proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono varia entre 0,2 e 1,38 g/L. Neste estudo, a concentração máxima alcançada ficou dentro dessa faixa média, atingindo 0,78 g/L para *B. subtilis* e 1,07 g/L para *B. pumilus*, valores semelhantes aos reportados na literatura para a produção de surfactina por essas bactérias.

5.1.3 Análise dos parâmetros cinéticos da produção de biossurfactantes

As características cinéticas para o crescimento microbiano em uma incubadora rotativa orbital utilizando a linhagem de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* estão detalhados da Tabela 5.2. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da linhagem *B. subtilis* foi de 0,0569 h⁻¹ e para a linhagem *B. pumilus* foi de apenas 0,0063h⁻¹, o que demonstra a melhor adaptação às condições de cultivo da linhagem *B. subtilis*. Ao analisar os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$ (gx/gs)), pode-se verificar que o substrato foi mais bem assimilado pela linhagem *B. subtilis*, que proporcionou melhor produtividade em células (P_x) e em conversão em biossurfactante ($Y_{p/s}$ (gp/gs)).

Tabela 5.2 - Parâmetros cinéticos do cultivo *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*

Parâmetros	Valor (<i>B. subtilis</i>)	Valor (<i>B. pumilus</i>)
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,0569	0,0063
t_g (h)	12,1818	11,5140
P_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,0121	0,0086
$Y_{X/s}$ (g_x/g_s)	0,0840	0,0200
$Y_{P/s}$ (g_p/g_s)	0,3120	0,1000

Legenda: $\mu_{\text{máx}}$ – velocidade específica máxima de crescimento; t_g – tempo de geração; P_x – produtividade em células; $Y_{X/s}$ – fator de conversão de substrato em células; $Y_{P/s}$ – fator de conversão de substrato em produto.

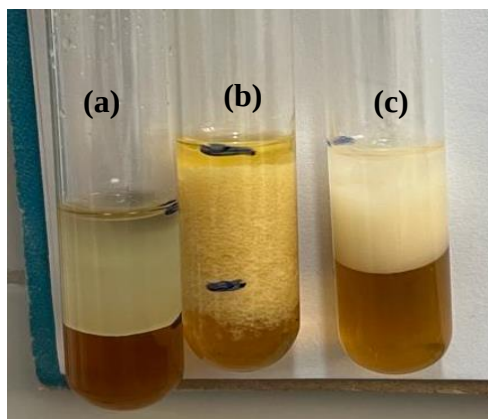
Fonte: Autor (2023)

Suwansukho e colaboradores (2008) descreveram o processo de geração de biossurfactante por *B. subtilis* MUV4 em meio de glicose, alcançando uma taxa máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) de $0,14 \text{ h}^{-1}$, no qual demonstra que os resultados obtidos neste trabalho são satisfatórios para *B. subtilis* por estar dentro à faixa média. Já em condições de comparação a *B. pumilus* os resultados foram praticamente idênticos a respeito à esta análise.

5.2 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Os resultados de índices de emulsificação mostram a capacidade de emulsificação dos biossurfactantes obtidos pelas linhagens *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus* em compostos hidrofóbicos como óleo de motor, óleo vegetal e querosene. O índice de emulsificação (IE) foi analisada no intervalo de 24 e 240 h de repouso, sendo a medida indireta que indica a presença de biossurfactante nos cultivos.

Figura 5.3 - Análise de índice de emulsificação com compostos hidrofóbicos (a) óleo vegetal; (b) óleo de motor e (c) querosene.



Fonte: Autor (2024).

Segundo Yousself (2004) para que a emulsificação seja eficaz, o seu índice de emulsificação deverá ser maior que 40%. De acordo com Coalla e Costa (2003), muitos microrganismos têm a capacidade natural de decompor ou assimilar hidrocarbonetos. Alguns desses microrganismos são capazes de formar emulsões com esses hidrocarbonetos durante o processo de degradação do substrato. Em um estudo sobre a estabilidade de biossurfactantes, Barros et al. (2008) investigaram o uso de hidrocarbonetos utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987), onde testaram o biossurfactante produzido pela cepa de *Bacillus subtilis* LB5 em combinação com hexano, obtendo um índice de emulsificação de 65%.

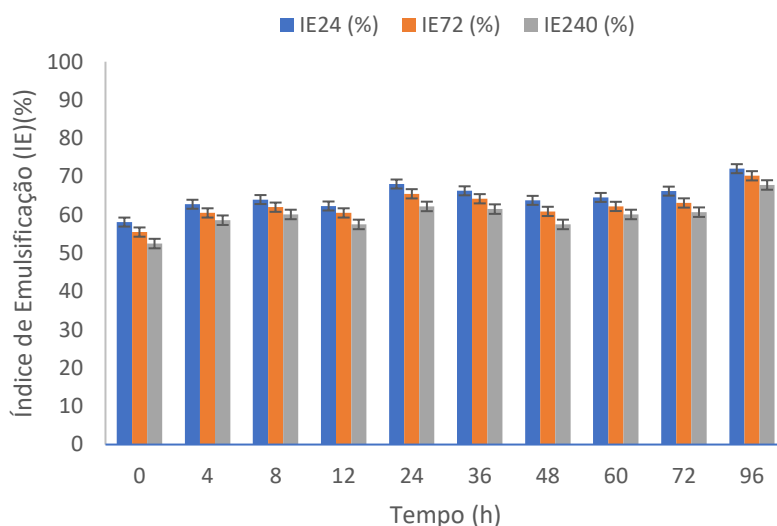
Segundo Zhang (2016) o glicerol é uma excelente fonte de carbono para o *Bacillus sp.* Em seu estudo, Sousa (2011) investigou as propriedades emulsionantes do biossurfactante produzido pelo *B. subtilis* em um meio mineral suplementado com glicerol. Durante o experimento, foram utilizados óleo de soja e n-hexadecano como compostos hidrofóbicos, resultando em índices de emulsificação de 43,3% e 53,3%, respectivamente.

Gasparin et al. (2012), ao investigar o índice de emulsificação utilizando óleos vegetais como substrato carbonado, concluíram que o óleo de milho não é ideal para a produção de biossurfactantes, sugerindo o óleo de soja como a escolha mais eficiente. Por outro lado, França et al. (2015) destacam que óleos vegetais e glicerol são fontes adequadas de carbono para este propósito.

5.2.1 Índice de emulsificação com *Bacillus subtilis*

A Figura 5.4 representa o índice de emulsificação da mistura do sobrenadante obtido do processo com *Bacillus subtilis* com os compostos hidrofóbicos óleo de motor (soja). Observa-se que após 24 h de contato, a emulsificação com óleo de motor, apresenta um leve aumento gradual quanto a tempo de contato da amostra, na qual todas as amostras obtiveram valores de emulsificação acima de 50%, representando emulsificação satisfatória, a qual a amostra com 96 h de cultivo obteve valor de emulsificação de 72,1 %. Esse estudo foi analisado durante 24 a 240h, nota-se que ao longo do tempo de contato da formação de emulsão, as amostras tiveram pouca diferenciação com o composto hidrofóbico óleo de motor, alcançando reduções próxima a 5% no período de 24, 72 e 240 h.

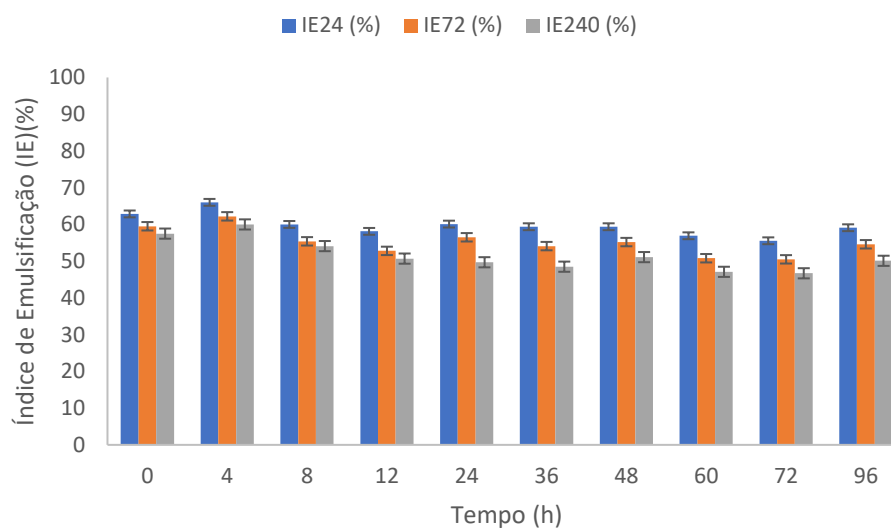
Figura 5.4 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por *Bacillus subtilis* – Óleo de motor



Fonte: Autor (2023)

A Figura 5.5 está representando o índice de emulsificação do sobrenadante obtido com composto hidrofóbico óleo vegetal, no qual apresentou estabilidade ao longo do cultivo das amostras, em média valores representativos acima de 60%, apresentando emulsificação satisfatória, atingindo o melhor resultado o cultivo com 4 h de contato. No decorrer da análise, observa que há uma redução da formação da emulsão na faixa de tempo entre 24 e 240 h do estudo, atingindo valores superiores a 45% após o período.

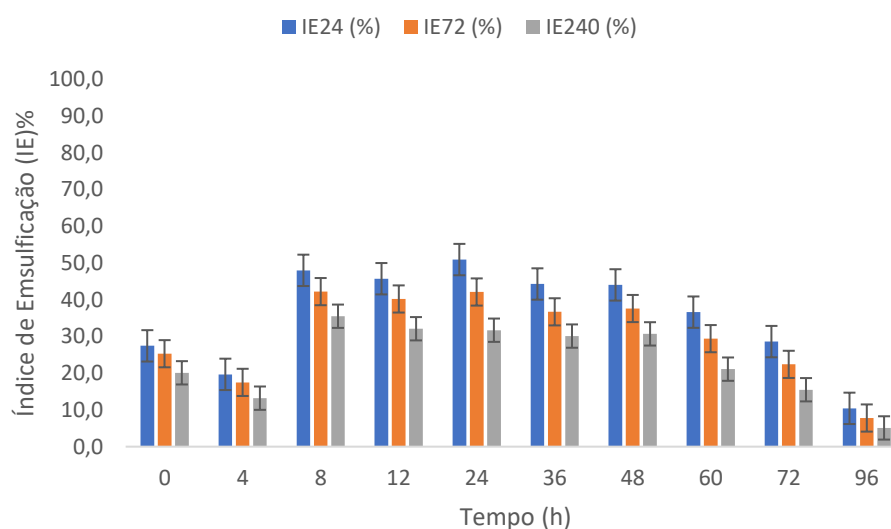
Figura 5.5 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por *Bacillus subtilis* – Óleo Vegetal



Fonte: Autor (2024)

A Figura 5.6 há representação da análise do índice de emulsificação do sobrenadante obtido com *B. subtilis* contendo querosene. Nota-se que as amostras que tiveram contato entre 8 e 48h de contato obtiveram os melhores resultados de emulsificação com o composto querosene. A amostra 5 (24h) teve emulsão acima de 50%, e ao longo do período de contato da emulsão reduziu para 31,7% de emulsão após 240h da análise.

Figura 5.6 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por *Bacillus subtilis* – Querosene



Fonte: Autor (2024)

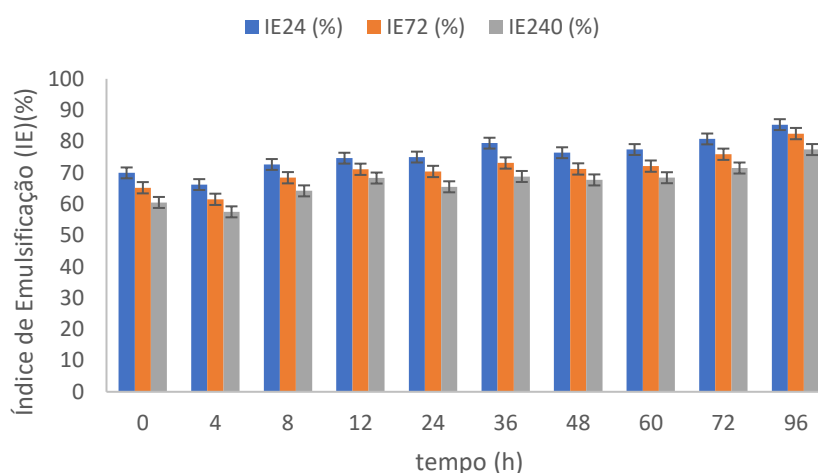
Portanto, o biossurfactante produzido pela linhagem de *B. subtilis* tem boa emulsificação frente ao composto hidrofóbico óleo de motor, óleo vegetal e querosene no período de 24 h de emulsão, porém foi notado após 72 h de análise do índice de emulsificação, o composto querosene não representa valores satisfatórios, muito provavelmente, devido a característica molecular, considerando que o querosene é constituído de uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos. Portanto, cadeia carbônica extensa o que pode dificultar a interação com os componentes que formam a estrutura do biossurfactantes do tipo lipopeptídeos (BARROS *et al.*, 2008).

5.2.2 Índice de emulsificação com *Bacillus pumilus*

As Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 ilustram os índices de emulsificação do sobrenadante gerado pela linhagem *B. pumilus* em contato com os compostos hidrofóbicos óleo de motor, óleo vegetal e querosene.

A Figura 5.7 está representando o índice de emulsificação com composto hidrofóbico óleo de motor, na qual foi realizado análise entre 24 e 240 h de contato. Observa-se que o maior índice de emulsificação foi 77,4%, obtido com amostra de 96 h de cultivo, e as demais estão acima de 70% de emulsão. Nota-se que entre o período de 24, 72 e 240 h de análise da emulsificação, houve uma redução média de 10% de emulsão das amostras, na qual ficaram superiores a 50% após 240 h de emulsão.

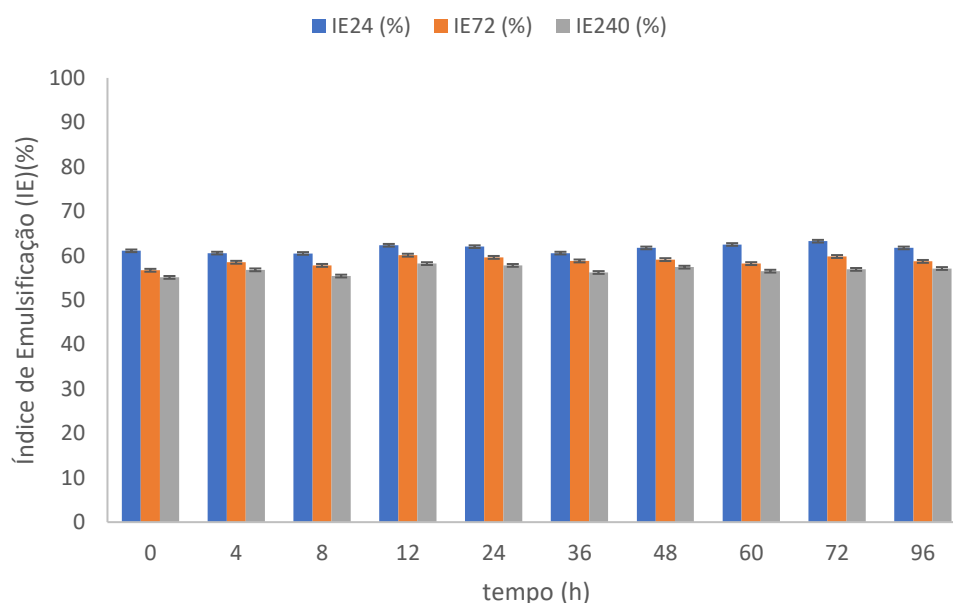
Figura 5.7 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por *Bacillus pumilus* –Óleo de motor



Fonte: Autor (2024)

Já a Figura 5.8 representa o índice de emulsificação, agora em contato com composto hidrofóbico óleo vegetal (soja), nota-se que há estabilidade em todas as amostras presentes, mantendo-se índice de emulsificação acima dos 60% durante as 24 h iniciais da análise, porcentagem considerada satisfatória para maioria dos biossurfactantes microbianos. Os valores reduzem em média 5% após o período de 240 h de análise, atingindo números superiores a 50%.

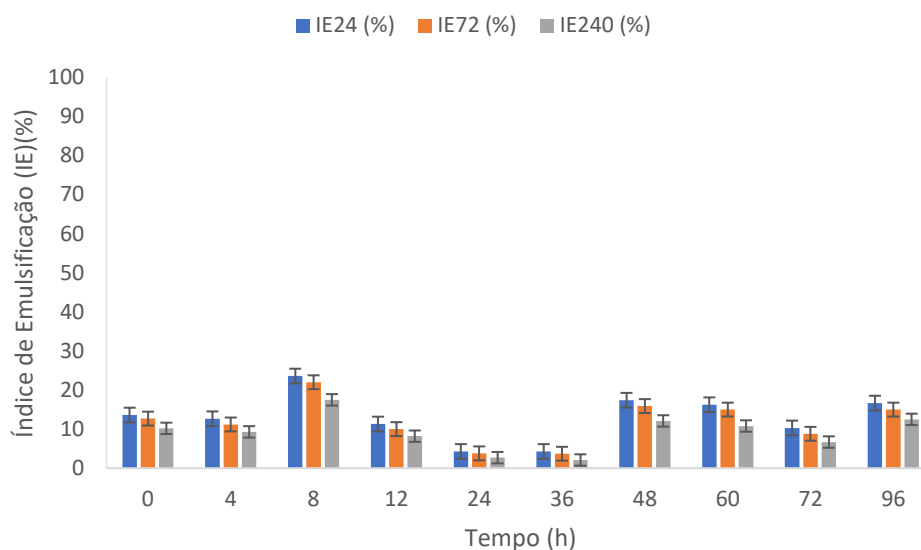
Figura 5.8 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por *Bacillus pumilus* – Óleo vegetal



Fonte: Autor (2024)

Por fim, a Figura 5.9 está representando o índice de emulsificação contendo querosene. Nota-se que ambas as amostras determinaram resultados não satisfatórios, na qual a amostra 3 (8h de cultivo) obteve o melhor resultado, 23,6% de emulsão, a qual após 240 h da análise, reduziu este resultado para 17,5%.

Figura 5.9 - Índice de emulsificação do sobrenadante produzido por *Bacillus pumilus* – Querosene



Fonte: Autor (2024)

5.3 ETUDOS DE ESTABILIDADE

A ampla variedade de moléculas de biossurfactantes resulta em diversas propriedades físico-químicas, que são determinantes para suas aplicações específicas. A capacidade de manter a estabilidade frente a alterações como temperatura, pH e salinidade aumenta significativamente seu potencial para aplicações industriais, especialmente no setor de petróleo.

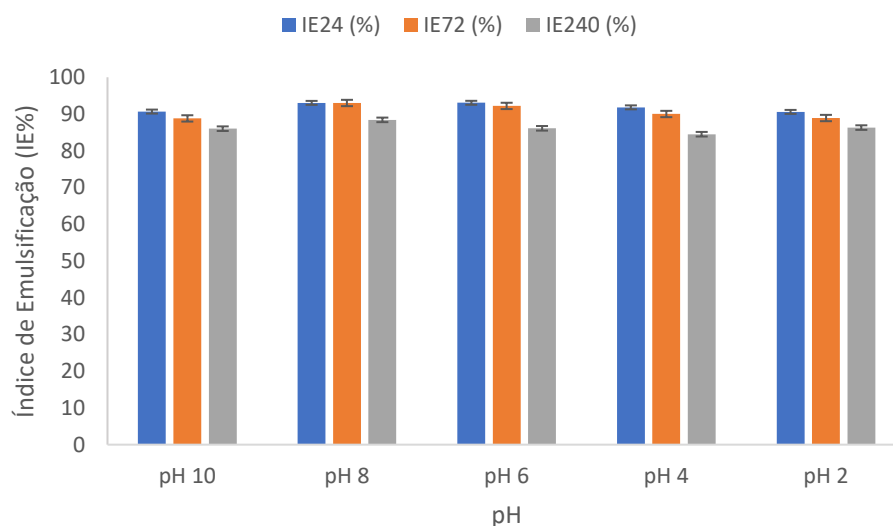
As análises foram realizadas a partir dos melhores resultados obtidos com a maior formação de biomassas presentes das amostras. Cada análise foi realizada separadamente, utilizando compostos hidrofóbicos óleo de motor, óleo vegetal e querosene, para estudar a capacidade de estabilidade em condições distintas. Cada análise teve observado em períodos de 24, 72 e 240 h após o início do estudo.

5.3.1 pH

O sobrenadante foi analisado frente à variação de diferentes valores de pH, na faixa de 2 a 10, utilizando compostos hidrofóbicos: óleo de motor, óleo vegetal e querosene. De acordo com a Figura 5.10, pode-se observar que a estabilidade frente a pH utilizando óleo de motor com o sobrenadante de *B. subtilis* manteve praticamente a mesma, obtendo valores acima de 90% em todas as mudanças de pH. Após período de 240h, nota-se que houve pouca variação,

considerando uma redução aproximada de 5% ao longo do tempo determinado. A amostra analisada ajustada com pH 4 representa o menor valor da estabilidade no estudo, verificando após 240 h a redução para 84,5% de estabilidade de emulsificação.

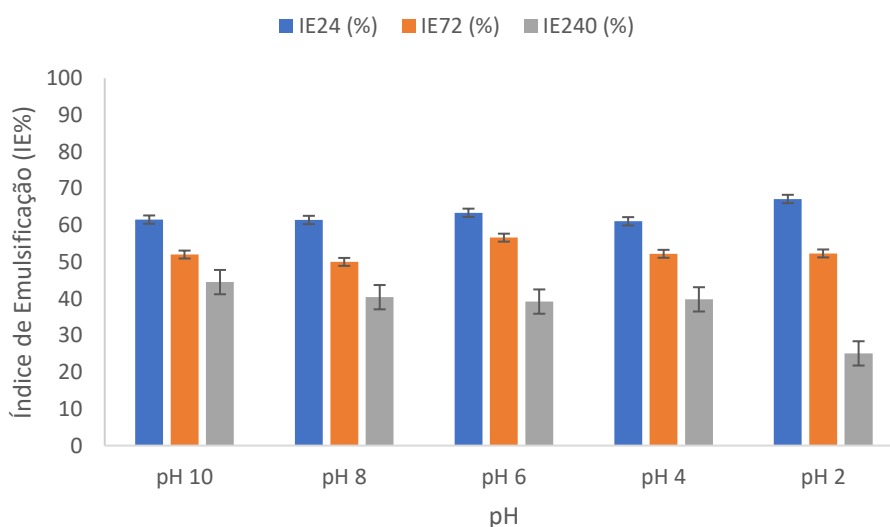
Figura 5.10 - Estabilidade de emulsificação de pH – *Bacillus subtilis* com Óleo de motor



Fonte: Autor (2024)

A Figura 5.11 representa a estabilidade de alterações de pH utilizando o composto óleo vegetal (soja). Nota-se que os valores estão acima dos 50% de estabilidade em alterações de pH nas primeiras 24 h da análise. Houve uma redução mais significativa na amostra que foi ajustado pH 2, com valor 25,1% representando uma diminuição da emulsificação em 30%.

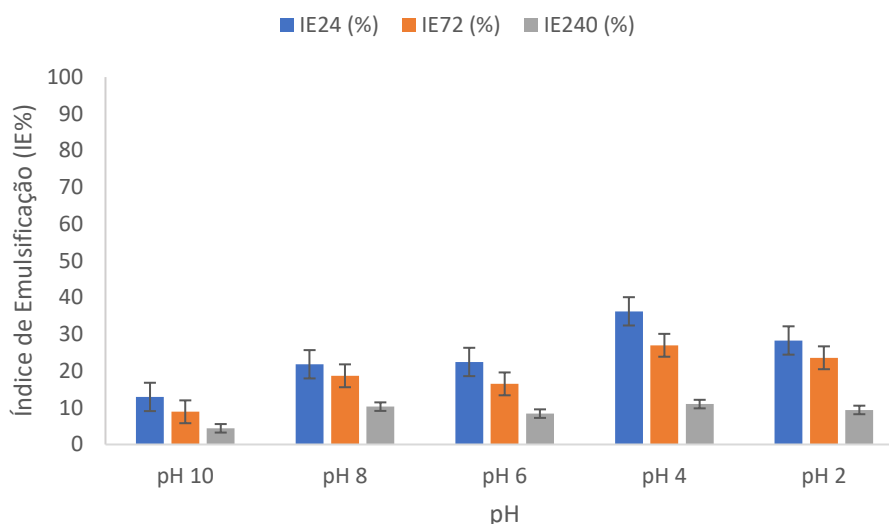
Figura 5.11- Estabilidade de emulsificação de pH – *Bacillus subtilis* com Óleo vegetal



Fonte: Autor (2024)

Do mesmo modo, foi realizado a análise utilizando o sobrenadante com a variação do pH, mas desta vez utilizando o composto querosene. Representado na Figura 5.12, nota-se que não obteve valores significativos em nenhuma análise das variações de pH. Percebe que a estabilidade da amostra com reajuste do pH 4 está mais expressiva, porém, não atinge 40% de emulsificação, e reduzido ao longo das 240 h de análise, atingindo 11% de emulsão.

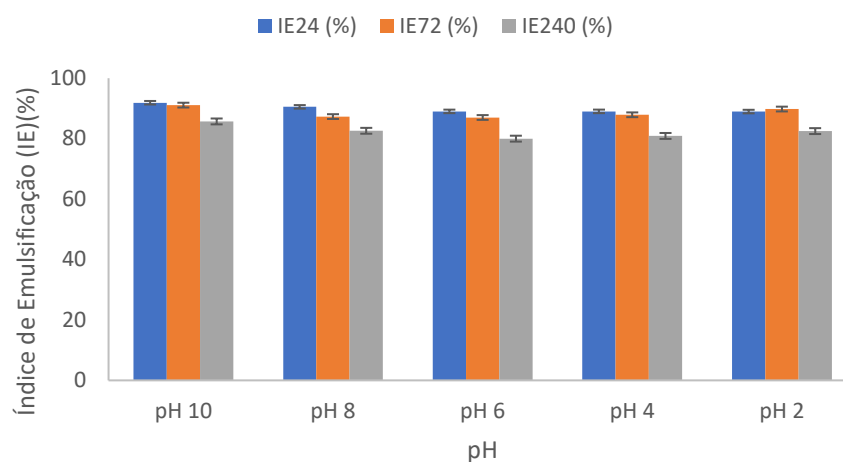
Figura 5.12 - Estabilidade de emulsificação de pH – *Bacillus subtilis* com Querosene



Fonte: Autor (2024)

Os mesmos estudos foram realizados para a linhagem de *B. pumilus*, na qual foram utilizados o seu sobrenadante produzido e compostos hidrofóbicos óleo de motor, óleo vegetal e querosene. A Figura 5.13 representa a estabilidade do sobrenadante da produção com óleo de motor. Observa-se valores significativos, os quais atingem 90% de estabilidade diante as alterações de pH, e ao longo do tempo de contato, 240 h, pouco houve alterações, representando boa estabilidade frente ao pH.

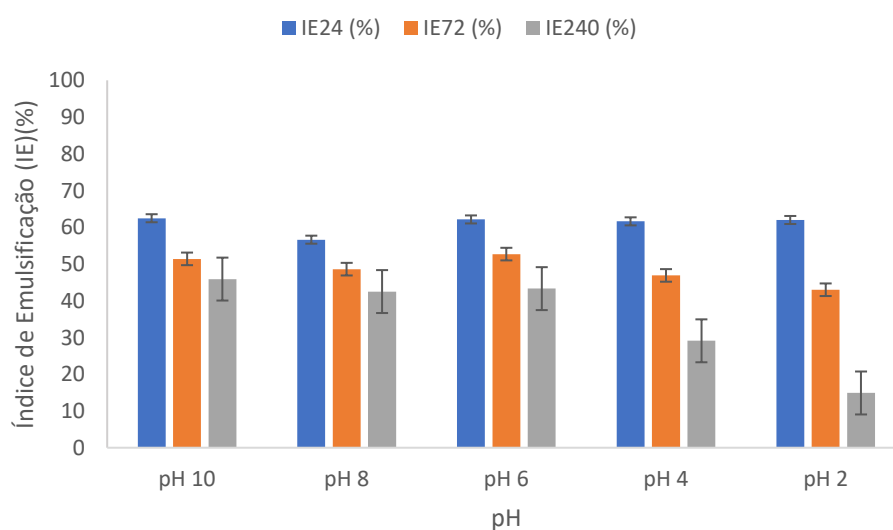
Figura 5.13 - Estabilidade de emulsificação de pH – *Bacillus pumilus* com Óleo de motor



Fonte: Autor (2024)

A Figura 5.14 está representando o estudo da estabilidade frente a variação de pH utilizando agora o composto hidrofóbico óleo vegetal. Pode-se observar que durante as primeiras 24 h há estabilidade para as variações de pH, alcança valores próximos a 60%. Porém, ao passo em que há mais tempo de contato, a emulsificação é reduzida, alcançando reduções de até 47,1% (pH 2), determinando que para o estudo com baixos níveis de pH, não há estabilidade de emulsão.

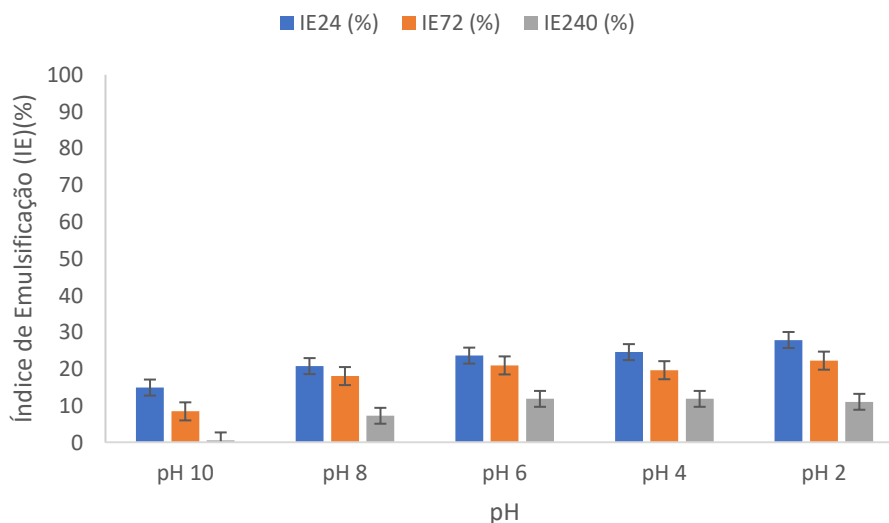
Figura 5.14 - Estabilidade de emulsificação de pH – *Bacillus pumilus* com Óleo vegetal



Fonte: Autor (2024)

Por fim, foi realizada a análise do sobrenadante com valores de pH ajustados, utilizando o composto querosene para ser avaliado Figura 5.15. Pode-se observar que os valores não foram significativos, em cada amostra com valores de pH distintos, não obteve resultados satisfatórios. A amostra ajustada com pH 2 teve 27,8 % de emulsificação nas primeiras 24 h de contato, porém, após 240 h de contato, reduziu significativamente para 11% a sua emulsão.

Figura 5.15- Estabilidade de emulsificação de pH – *Bacillus pumilus* com Querosene



Fonte: Autor (2024)

Logo, pode-se determinar que para os sobrenadantes produzidos por *B. subtilis* tão quanto por *B. pumilus* em contato com óleo de motor e óleo vegetal (soja) possuem estabilidade mesmo em variações do pH. Por outro lado, foi possível concluir que ambas as linhagens em estudo de variações de pH em contato com o composto querosene não há estabilidade.

Segundo Syahriansyah et al. (2016) examinaram a estabilidade de um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* diante de variações de pH, temperatura e salinidade, observando que a tensão superficial da amostra foi alterada com as mudanças de pH. Os pesquisadores concluíram que a surfactina demonstra maior estabilidade em pH alcalino do que em pH ácido.

No estudo realizado por Nitschke et al. (2015), também foi observada a redução da estabilidade da surfactina em pH ácido. Explicam que isso se deve à tendência da surfactina de precipitar em valores de pH inferiores a 5. Wei et al. (2003) investigaram a produção de biossurfactante pelo *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio enriquecido com ferro e observaram que a adição de ferro resultou na redução do pH do meio. Os autores investigaram a produção de surfactina em amostras de meio com pH reduzido, especialmente naquelas que foram acidificadas. Como resultado, concluíram que a diminuição do pH do meio causou a precipitação da surfactina.

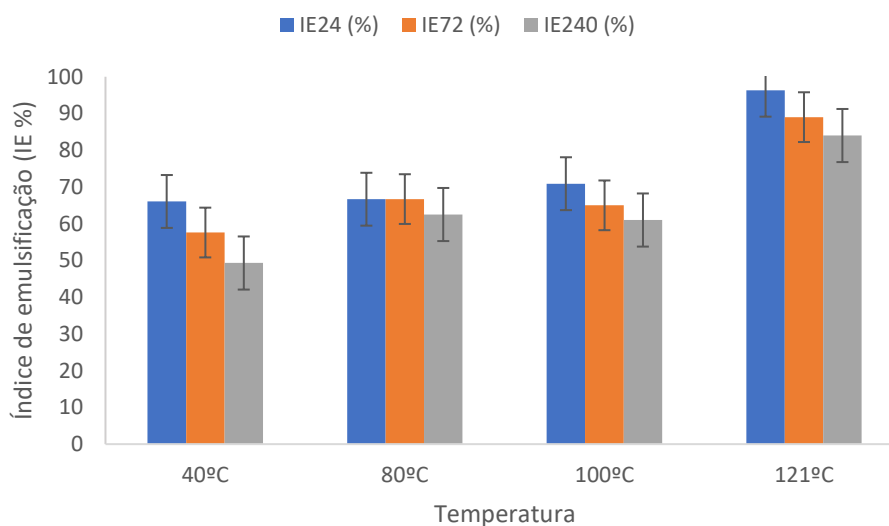
Cooper et al. (1987) também observaram que a acidificação da amostra de surfactina resultou em um aumento da tensão superficial. Entretanto, ao neutralizar novamente a amostra, a tensão superficial diminuiu, indicando que a estrutura da molécula não foi modificada. Esse padrão revela a sensibilidade da estrutura química da surfactina em relação ao pH.

5.3.2 Temperatura

O estudo da estabilidade térmica do sobrenadante foi avaliada através das variações de temperatura, 40°, 80°, 100° e 121°C, e ao longo do tempo de contato. Para ser feito o estudo, foram utilizados os sobrenadantes produzidos pelas linhagens *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* em contato com compostos hidrofóbicos óleo de motor, óleo vegetal (soja) e querosene.

A Figura 5.16 representa a estabilidade do sobrenadante produzido por *Bacillus subtilis* em contato com óleo de motor com variações de temperatura. Nota-se que após 24 h de análise a amostra que obteve melhor resultado foi em temperaturas mais elevadas, a 121°C, obtendo valor acima de 95%, e após 240 h, houve a redução desta emulsão, atingindo valores acima de 80%.

Figura 5.16- Estabilidade de emulsificação de temperatura – *Bacillus subtilis* com Óleo de motor

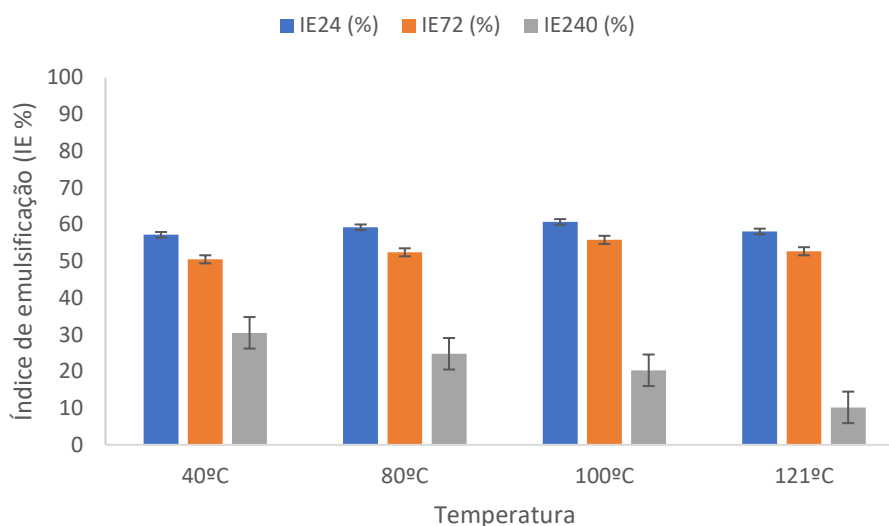


Fonte: Autor (2024)

A Figura 5.17 está representando a estabilidade do substrato produzido por *B. subtilis* com o composto hidrofóbico óleo vegetal (soja). Percebe que não há diferenciações das emulsões com variações de temperatura nas primeiras 24 h, porém, ao passar do tempo de contato, a reduções significativas nas emulsões. A amostra que teve sua temperatura ajustada a 121 °C teve uma redução de 48% após 240 h. As demais amostras após 240 h de contato

reduziram aproximadamente 25% da emulsão. Assim, pode-se inferir que, com variações de temperatura e utilizando composto hidrofóbico óleo vegetal, não há estabilidade térmica.

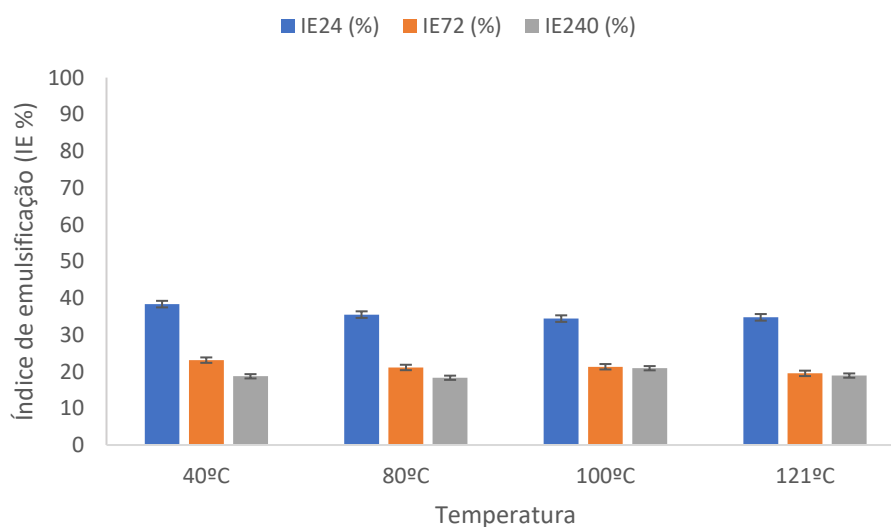
Figura 5.17 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – *Bacillus subtilis* com Óleo vegetal



Fonte: Autor (2024)

Já a Figura 5.18 abaixo está representando o estudo da estabilidade térmica, desta vez utilizando o composto querosene.

Figura 5.18 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – *Bacillus subtilis* com Querosene

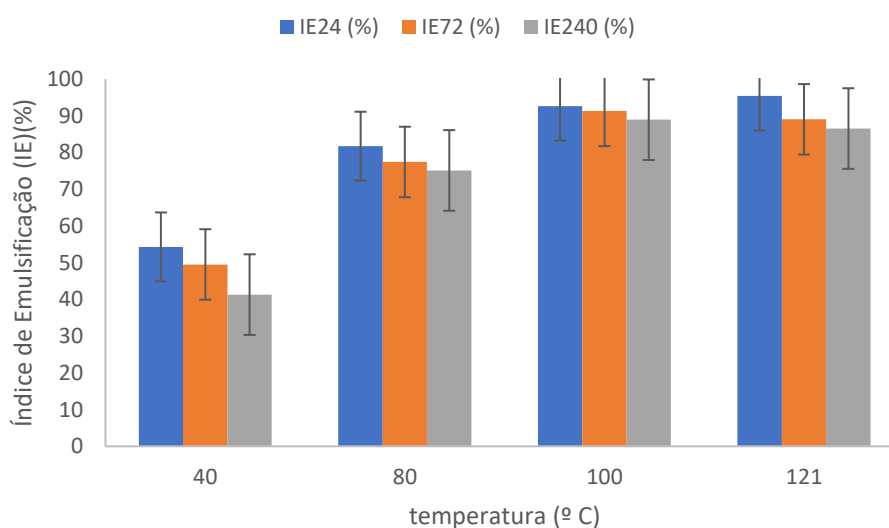


Fonte: Autor (2024)

Nota-se que nas primeiras 24 h há semelhança nas emulsões com alterações na temperatura, porém não atingem valores superiores a 40%. Após 240 h de contato deste estudo, percebe-se que há uma redução acentuada das emulsões, acarretando reduções inferiores a 20%.

Os mesmos estudos foram realizados para a linhagem de *B. pumilus*, na qual foram utilizados o seu sobrenadante produzido, com variações de temperatura, e compostos hidrofóbicos óleo de motor, óleo vegetal e querosene. A Figura 5.19 representa a estabilidade do sobrenadante da produção com óleo de motor. Observa-se valores significativos, apenas a amostragem com temperatura a 40°C que representou o menor valor de emulsão, superior a 50%, as demais com alterações superiores da temperatura foram ainda mais significativas. Mesmo após 240 h de contato, as amostras apresentaram boa estabilidade.

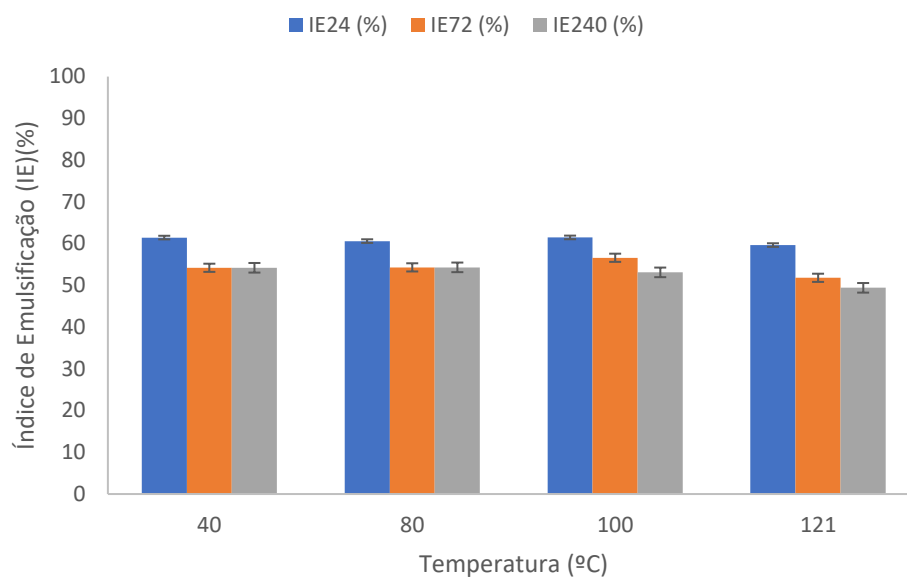
Figura 5.19 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – *Bacillus pumilus* com Óleo de motor



Fonte: Autor (2024)

Já a Figura 5.20 está representando o estudo da estabilidade térmica, agora utilizando o composto óleo vegetal (soja). Nota-se que nas primeiras 24 h há semelhança nas emulsões com alterações na temperatura, atingindo valores superiores a 60%. Após 240 h de contato deste estudo, percebe-se que há pouca variação de redução das emulsões.

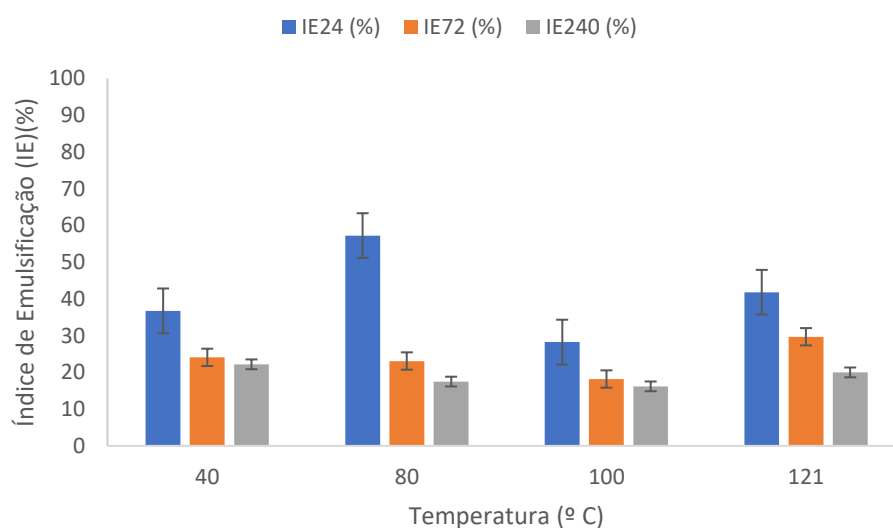
Figura 5.20 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – *Bacillus pumilus* com Óleo vegetal



Fonte: Autor (2024)

Por fim, foi realizada a análise do sobrenadante com valores de temperatura ajustados, utilizando o composto querosene para ser avaliado, representados pela Figura 5.21. Pode-se observar que os valores não foram significativos, apenas a amostra com temperatura com 80°C teve emulsão acima de 50% após 24 h de contato. Esta amostra, após 240 h de contato, teve uma redução acentuada, reduzindo para 17,5%, determinando não ser estável em variações de temperatura.

Figura 5.21 - Estabilidade de emulsificação de temperatura – *Bacillus pumilus* com Querosene



Fonte: Autor (2024)

Logo, pode-se inferir que para os sobrenadantes produzidos por *Bacillus subtilis* tão quanto por *Bacillus pumilus* em contato com óleo de motor e óleo vegetal (soja) possuem estabilidade mesmo em variações da temperatura. Por outro lado, pode-se concluir que ambas as linhagens em estudo de variações de temperatura em contato com composto querosene não há estabilidade.

Barros et al. (2008) descrevem que os biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus subtilis* são conhecidos por apresentarem uma excelente estabilidade térmica, afirmando em seus estudos a estabilidade térmica do biossurfactante produzido pela linhagem em uma faixa de temperatura de 20° a 100°C e constataram que não houve alteração significativa na atividade de superfície do biossurfactante.

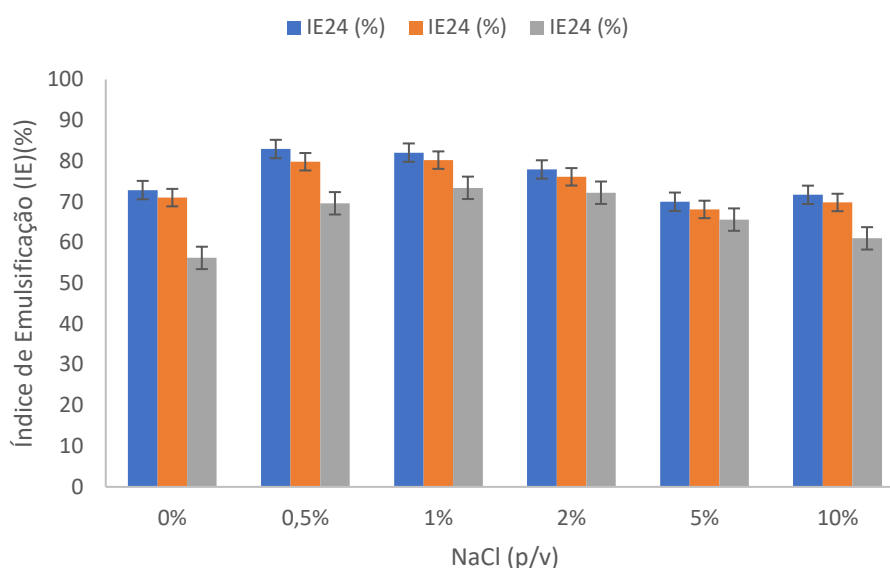
É importante destacar que a amostra testada demonstrou estabilidade mesmo após ter sido exposta ao processo de autoclavagem a 121°C. Segundo Zulkifli (2019) descreve que a eficiência da maioria dos surfactantes sintéticos diminui consideravelmente em temperaturas acima de 100°C, devido à instabilidade química da molécula. Isso restringe sua aplicação em ambientes que exigem resistência térmica elevada, como reservatórios de petróleo, por exemplo.

Zulkifli (2019) et al. abordam a aplicação de certos surfactantes sintéticos em reservatórios de petróleo. A escolha de um surfactante adequado para essas condições é bastante desafiadora devido à sensibilidade da maioria desses produtos a temperaturas elevadas, variando de 80 a 106°C, e a altas concentrações de salinidade, cerca de 3,2% (m/v).

5.3.3 Estabilidade frente a força iônica

Os sobrenadantes das linhas produzidas por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* foram testados também frente a diferentes concentrações de NaCl. A Figura 5.22 representa o contato do sobrenadante produzido por *Bacillus subtilis* com variações de íons e utilizando composto hidrofóbico óleo de motor. Nota-se que há valores significativos em todas as amostras após 24 h de contato, atingindo valores superiores a 70%, e após 240 h de contato, ocorreu reduções, porém ainda ficaram superiores a 60% de emulsões. Logo, representando boa estabilidade frente as forças iônicas distintas.

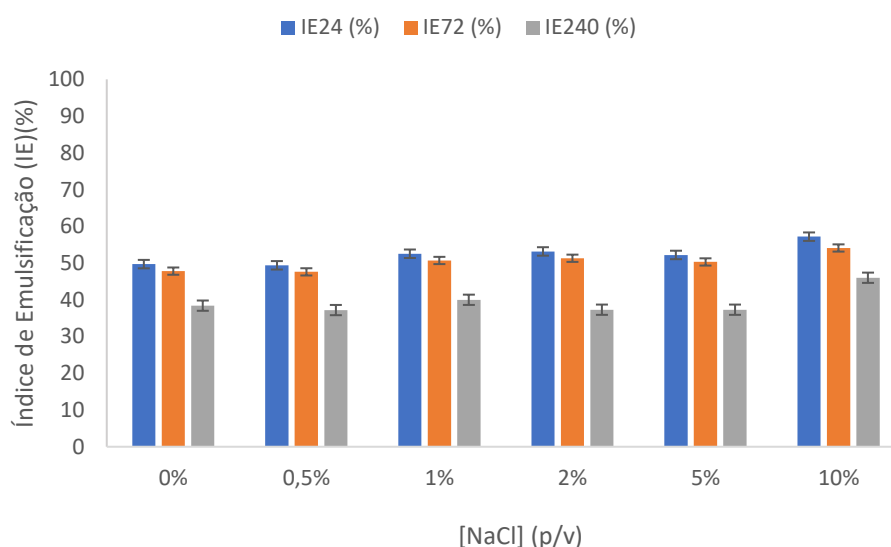
Figura 5.22 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– *Bacillus subtilis* com Óleo de motor



Fonte: Autor (2024)

A Figura 5.23 está representando o estudo da estabilidade iônica, agora utilizando o composto óleo vegetal (soja). Nota-se que nas primeiras 24 h há semelhança nas emulsões com alterações frente as concentrações de NaCl, atingindo valores superiores a 50%. Após 240 h de contato deste estudo, percebe-se que há reduções das emulsões, chegando a 40%, assim aferindo que o estudo utilizando o sobrenadante produzido por *Bacillus subtilis* em contato com composto óleo vegetal, não é estável para variações das concentrações de NaCl.

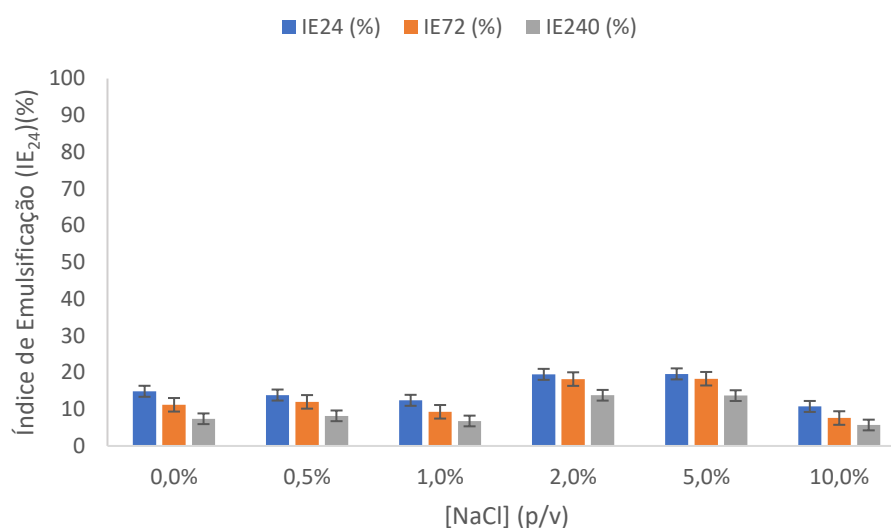
Figura 5.23 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– *Bacillus subtilis* com Óleo vegetal



Fonte: Autor (2024)

A Figura 5.24, representa a análise do sobrenadante com ajustes das concentrações de NaCl, utilizando o composto querosene para ser avaliado. Pode-se observar que os valores não foram significativos, todas as amostragens representam valores inferiores a 20% após 24 h de contato. Após 240 h de contato houve mais reduções das emulsões chegando inferior a 10%, inferindo não ser estável em variações de concentrações de NaCl.

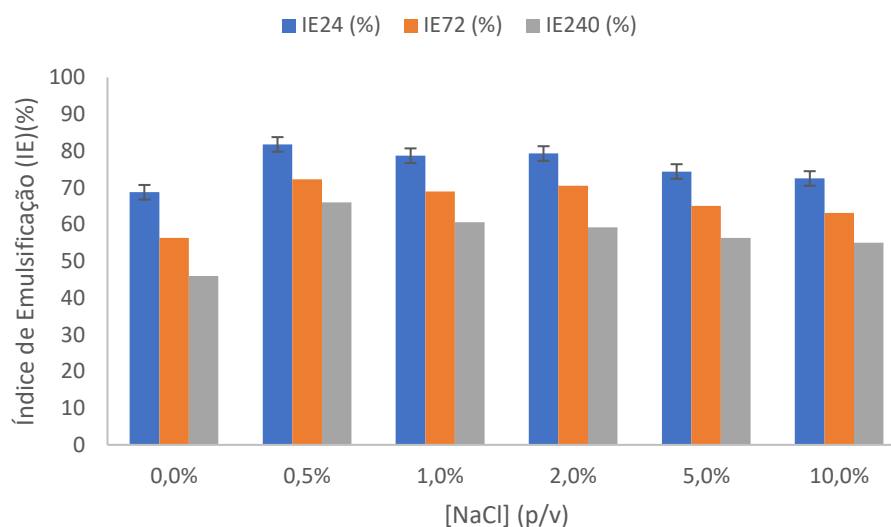
Figura 5.24 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– *Bacillus subtilis* com Querosene



Fonte: Autor (2024)

Os mesmos estudos foram realizados para a linhagem de *B. pumilus*. A Figura 5.25 representa a estabilidade do sobrenadante da produção com óleo de motor. Observa-se valores significativos, as amostragens apresentaram resultados expressivos após 24 h de contato do sobrenadante com variações de NaCl, acima de 70% de emulsão. Mesmo após 240 h, tiveram reduções as quais foram superiores a 40%, aferindo que o sobrenadante produzido pela linhagem *B. subtilis* é estável a variações de salinidade.

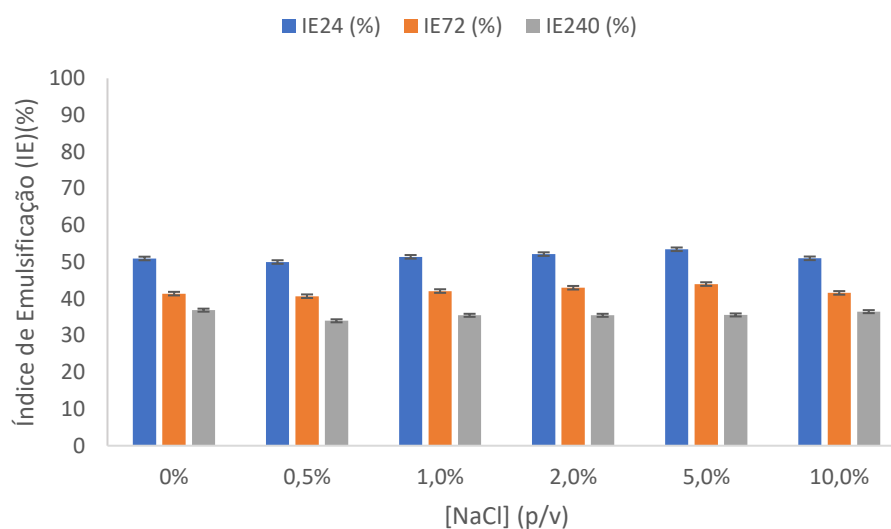
Figura 5.25 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– *Bacillus pumilus* com Óleo de motor



Fonte: Autor (2024)

A Figura 5.26, representa a análise do sobrenadante com ajustes das concentrações de NaCl, utilizando o composto hidrofóbico óleo vegetal para ser avaliado. Pode-se observar que os valores foram significativos após 24 h do início do estudo em todas as amostras, alcançando valores superiores a 50%. Após 240 h de contato houve maiores reduções das emulsões, ocasionando emulsões inferiores a 40%, inferindo não ser estável em variações de concentrações de NaCl.

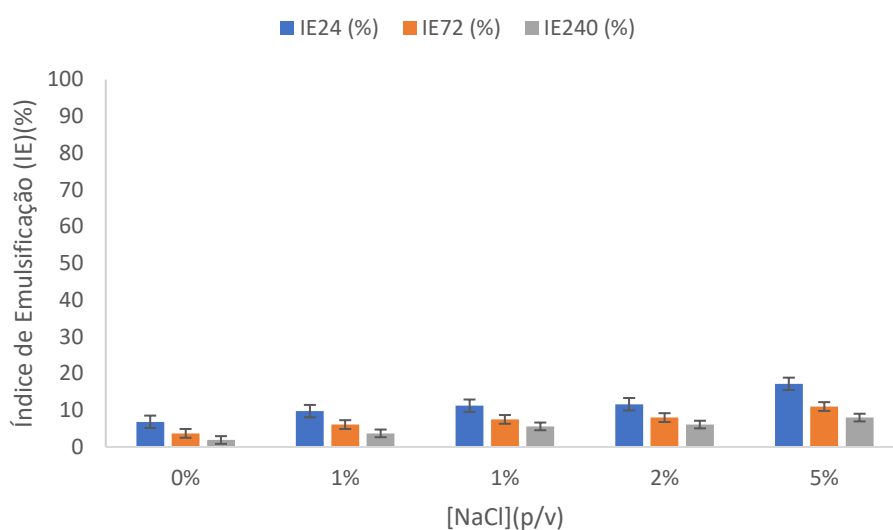
Figura 5.26 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– *Bacillus pumilus* com Óleo vegetal



Fonte: Autor (2024)

Por fim, foi realizada a análise do sobrenadante com valores de concentrações de NaCl ajustados, utilizando o composto querosene para ser avaliado, representados pela Figura 5.27 abaixo. Pode-se observar que os valores não foram significativos, a amostra com a concentração ajustada para 5% teve o melhor resultado (17,2%). Está mesma amostra, após 240 h de contato, teve redução ainda maior, atingindo 8% de emulsão, determinando não ser estável em variações de temperatura.

Figura 5.27 - Estabilidade de emulsificação de NaCl– *Bacillus pumilus* com Querosene



Fonte: Autor (2024)

Nitschke e Pastore (2004) também analisaram como o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* C9 se comporta em diferentes concentrações de NaCl, mostrando que o biossurfactante não se manteve estável quando a concentração de sal ultrapassou 20%.

Segundo Syahriansyah et al. (2016) observaram que surfactantes sintéticos se tornam instáveis em baixas concentrações de sal (2 a 3%). Em contraste, os biossurfactantes testados mostraram ser mais estáveis do que os sintéticos quando submetidos à variação na força iônica.

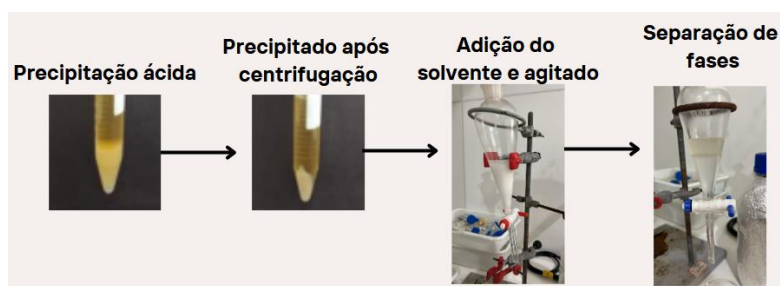
No presente estudo, as biomoléculas produzidas mostraram resistência significativa a condições adversas, como pH alcalino, altas temperaturas acima de 100°C e concentrações de sais acima de 5%. Isso sugere um grande potencial para serem aplicadas em várias áreas, como biorremediação em ambientes marinhos, recuperação avançada de petróleo e como agente antimicrobiano contra a biocorrosão.

6 RECUPERAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

Neste tópico, estão os resultados dos métodos usados para extrair e analisar os biossurfactantes produzidos pelas linhagens de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. Ambos os microrganismos foram tratados com a mesma técnica durante o processo.

Para tanto, foi realizado o estudo com uso das amostras que obtiveram maior concentração de biomassa contida após o crescimento do meio. Para a recuperação da biomassa da linhagem *B. subtilis* utilizou 85mL de sobrenadante e para a linhagem *B. subtilis* foram 70mL do sobrenadante obtido. A Figura 5.28 abaixo representa as etapas realizadas nesse estudo.

Figura 5.28 - Etapas de Recuperação dos Biossurfactantes



Fonte: Autor (2024)

A etapa inicial do processo de purificação envolve a precipitação ácida, que ocorreu logo após a separação das células do meio de cultivo. Baixos níveis de pH neutralizam as cargas nos aminoácidos da surfactina, fazendo com que a molécula se torne insolúvel em solução aquosa, formando agregados que se separam com o tempo por decantação. Essa abordagem simples e amplamente empregada, onde outras moléculas podem também ser precipitadas durante o processo (ROCHA, 2017; SEMIQUELI, 2014).

Após a etapa de precipitação ácida, realizaram-se três extrações utilizando solventes, um dos métodos mais eficazes para extrair surfactina, pois permite ajustar a polaridade para maximizar o rendimento da extração (CHEN et al., 2015). Após adicionar o solvente à amostra e agitar, observou-se a formação de duas fases distintas, com uma película esbranquiçada entre elas. Após remover a fase desejada, o processo de extração foi repetido mais duas vezes.

Segundo Zanotto et al. (2019), os métodos comumente usados para purificar lipopeptídeos incluem precipitação ácida, extração por solvente, fracionamento por espuma e adsorção. Entre essas técnicas, a precipitação ácida é frequentemente destacada como o método mais acessível e econômico para recuperar surfactina. De acordo com Chen et al. (2015), embora seja um método direto, a precipitação ácida não assegura um alto grau de purificação, ao contrário da extração por solvente. A técnica de extração por solvente utiliza a diferença de

solubilidade entre as impurezas e o produto alvo para purificação, sendo este último recuperado após a evaporação do solvente. Este método é frequentemente criticado por sua seletividade limitada, pois nem sempre consegue separar eficientemente as impurezas de outros lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* em comparação com a surfactina (DLAMINI, 2017).

A etapa mais crucial em termos de custos de produção é a purificação dos biossurfactantes, podendo representar até 60% do custo total do processo. A abordagem de separação dos biossurfactantes é adaptada conforme o bioprocessamento e as características físico-químicas específicas da molécula. A decisão sobre o método para purificar e recuperar a molécula de biossurfactante é influenciada pela carga da molécula, suas propriedades de solubilidade, se é produzido interna ou externamente à célula, e pelos custos envolvidos em cada processo (SHALIGRAM et al., 2010).

Para obter surfactina com alto grau de pureza, geralmente são necessárias várias etapas de processo, não sendo possível alcançar isso em apenas uma etapa. A quantidade de surfactina purificada no meio de cultura deve ser apropriada para o uso pretendido. Para aplicações relacionadas ao tratamento de metais pesados ou biorremediação, não é necessário alcançar altos valores de pureza. No entanto, em áreas médicas e cosméticos, a pureza da surfactina pode ser crucial, dependendo das considerações sobre segurança biológica do material obtido diretamente do meio de cultivo (DLAMINI, 2017).

7 CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

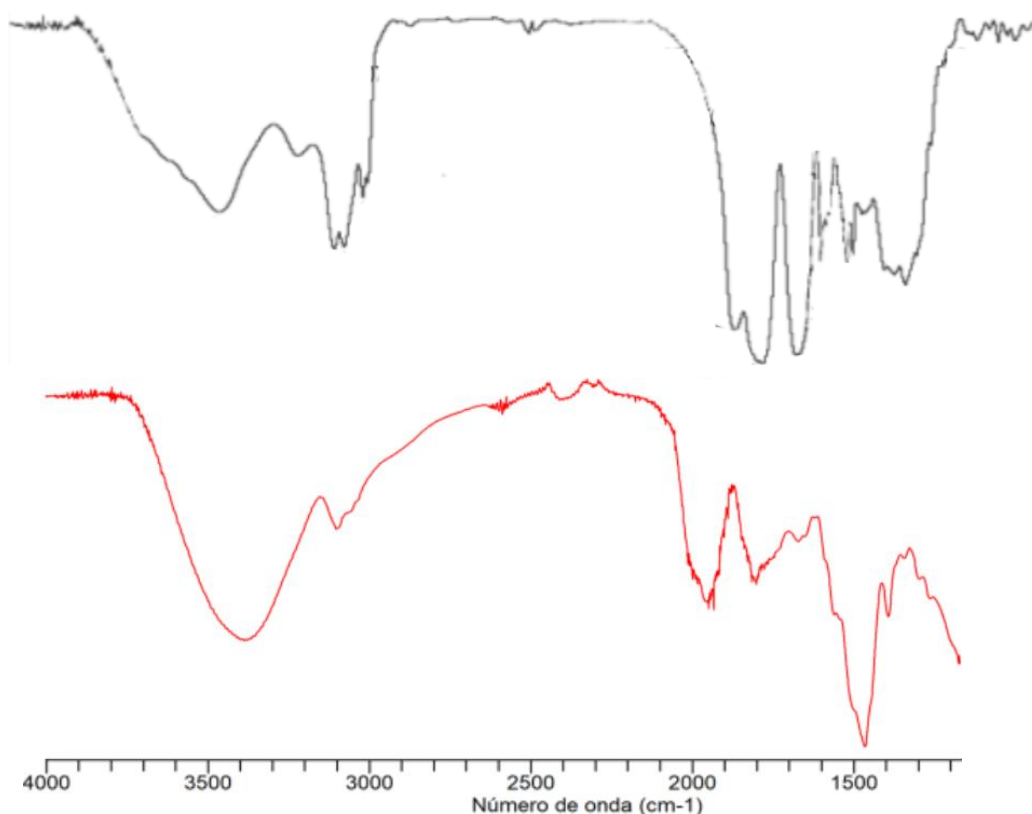
A técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para identificar os grupos químicos funcionais nos biossurfactantes produzidos pelas linhagens de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* neste trabalho.

A Figura 5.29 está representando os espectros de FTIR dos biossurfactantes produzidos e surfactina padrão. A análise indicou que o extrato apresentava padrões de transmitância semelhantes aos principais grupos característicos da molécula de surfactina. Contudo, a análise apresentou alguns ruídos, possivelmente devido a algum erro ocorrido durante o processo de recuperação.

As bandas de absorção mais relevantes foram identificadas comparando-se com os espectros obtidos por Sousa (2011). As bandas na faixa de 3200 a 3300 cm^{-1} , indicando o

estiramento da ligação N-H, típico de peptídeos. As bandas próximas de 2900 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento da ligação C-H dos grupos (CH_2) e (CH_3). A banda em 1700 cm^{-1} provavelmente indica o grupo C=O do grupo -COOH, relacionado ao grupo carbonila do anel lactona. Também foi identificada uma banda na região de 1600 a 1700 cm^{-1} , possivelmente típica da ligação CO-N, comumente encontrada em amidas de proteínas, o que indica a presença de grupos peptídicos. Os resultados mostraram que as bandas de absorção do extrato seguem o padrão da surfactina. Portanto, os biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* são caracterizados como lipopeptídeos, provavelmente pertencentes à família das surfactinas.

Figura 5.29 - Espectro na região infravermelho das amostras após recuperação (vermelho) e do padrão da surfactina (preto)



Legenda: preto – Surfactina Padrão / vermelho – Amostra

Fonte: Autor (2024)

8 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi evidenciada a habilidade da linhagem *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus* em sintetizar biossurfactantes ao utilizar o extrato da algaroba como substrato. Os biossurfactantes gerados exibiram uma excelente capacidade em relação à atividade de emulsificação, resultando valores acima dos 80% com a amostra com 96 horas de cultivo com o óleo de motor, e estabilidade em todas as amostras com relação ao óleo vegetal. Os resultados cinéticos obtidos confirmaram a capacidade de adaptação dos microrganismos ao meio de cultivo empregado, permitindo que tanto o *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 e *Bacillus pumilus* produzissem biossurfactantes com características similares a surfactina.

REFERÊNCIAS

- AL-BAHRY, S.N.; AL-WAHAIBI, Y.M.; ELSHAFIE, A.e.; AL-BEMANI, A.s.; JOSHI, S.J.; AL-MAKHMARI, H.s.; AL-SULAIMANI, H.s. 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>.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5 p. 495-508, 2000.
- BANAT, I.M., SATPUTE, S.K., CAMEOTRA, S.S., PATIL, R., NYAYANIT, N.V., 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Front. Microbiol.** 5, 697e708.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 28, n. 4, p. 979-985, dez. 2008.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, v. 13, n. 1, p. 85-103, 2003.
- CAMPOS, J.M., Stamford, T.L.M., Sarubbo, L.A., 2019. Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. **Biodegradation**. <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09877-8>
- CHEN, W. H.; JUANG, R. S., WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin produced by microorganism. **Biochemical Engineering Journal**, vol 103, p. 158-169. 2015
- COMMUNICATION EU COMMISSION, 2012. Innovating for sustainable growth: a bioeconomy for Europe. In: COM Brussels, 13.2.2012 COM (2012), 60 final.
- COOPER D. G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- COSTA, J. A. V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996. 203p.

- ČIMO, J., Šinka, K., Tárnik, A., Aydin, E., Kišš, V., and Toková, L. (2020). Impact of climate change on vegetation period of basic species of vegetables in Slovakia. **J. Water Land Dev.** 47, 38–46. doi: 10.24425/jwld.2020.135030
- CRUZ, J. M., HUGHES, C., QUILTY, B., MONTAGNOLLI, R., N., BIDOIA, E. D. Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 4, p. 613-618, 2018
- DHANARAJAN, G., SEN, R., 2015. Cost analysis of biosurfactant production from a scientist's perspective. In: Kosaric, N., Vardar-Sukan, F. (Eds.), *Biosurfactants*.
- 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.** Trabalho de Conclusão de Curso. Biotecnologia. Universidade Federal da Paraíba, 59f. 2019.
- DLAMINI, B. **Downstream purification of surfactin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 21332.** Dissertação. Univesidade de Stellenbosch, 2017.
- EARL, Ashlee M.; LOSICK, Richard; KOLTER, Roberto. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends In Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 269-275, jun. 2008.
- FARIA, A. F. **Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual.** Tese (Ciência de alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2010.
- GASPARIN, F. G. M., MAGRI, A., NEVES, A. F., CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de Lipase e Biossurfactante por Isolado de Efluente de Laticínio. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 28, 2012.
- GEETHA, S. J., BENAT, I.M., JOSHI, S.J., 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatal. Agric. Biotechnol.** 14, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>
- GIRI, S. S. et al. Role of *Bacillus licheniformis* VS16-Derived Biosurfactant in Mediating Immune Responses in Carp Rohu and its Applications to the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p. 23-32, 2018.
- HUDAK, A. J.; CASSIDY, D. P. Stimulating In-Soil Rhamnolipid Production in a Bioslurry Reactor by Limiting Nitrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, December 30, p.861-868, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia -- São Paulo: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008 p. 1020.

JANEK, T., GUDIÑA, E. J., POLOMSKA, 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**, v. 26, n. 12, 2021

KAPADIA, S.G., YAGNIK, B.N., 2013. Current trend and potential for microbial bio-surfactants. **Asian J. Exp. Biol. Sc.** 4, 234e251.

KIM, H.; YOON, B., LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.; Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 41-46, 1997.

KIRAN, G. S.; THOMAS, T. A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A.P.: Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2389-2396, 2010.

KOSARIC, N., VARDAR-SUKAN, F., 2015. Biosurfactants. Production and Utilization processes, Technologies, and Economics. CRC Press Taylor & Francis Group.

LANG, S. Biological Amphiphiles: Microbial Surfactants. *Opinion in Colloid and Interface Science*, 7:1230, 2002.

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, 52:101116, 2003.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S., BANAT, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Exp.** 1, 5.

MAKKAR. R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. **Journal of Surfactants and Detergents**, Germany, v. 5, p.11-17, 2002.

MANO, Mario Cezar Rodrigues. **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.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W. e YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 419–435, 2015.

MORDOR INTELLIGENCE RESEARCH & ADVISORY. (2024, JUNE). Surfactants Market Size - Industry Report on Share, Growth Trends & Forecasts Analysis (2024 - 2029). Mordor Intelligence. Retrieved August 2, 2024, from <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/surfactants-market>.

MULLIGAN, C.N. Enviromental applications for biosurfactants, Environ. **Pollut.**133 (2005) 183–198.

MUKHERJEE, S., DAS; P.; SEN, R. Towards Commercial Production of Microbial Surfactants. **TRENDS in Biotechnology**, 24:509515, 2006.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G., HADDAD, R., GONÇALVES, L. A. G., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

OSTENDORF, T. A. et al. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. *Journal of biotechnology*, 2019.

PARASZKIEWICZ, K. Biosurfactant enhancement factors in microbial degradation processes. In: Długonski, J. (Ed.), **From Omics to Function and Application**, 2016.

PARVATHI, A., KRISHNA, K., JOSE, J., JOSEPH, N., NAIR, S., Biochemical and Molecular Characterization of *Bacillus Pumilus* Isolated From Coastal Environment in Cochin, India, 2009.

PECCI, Y., RIVARDO, F., MARTINOTTI, M.G., ALLEGRONE, G., 2010. LC/ESI-MS/MS characterization of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis*

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 277-289, 2018.

RIBEIRO, B. G. et al. Production and Optimization of the Extraction Conditions of a Biosurfactant of *Candida Utilis* Ufpeda1009 with Potential of Application in the Food Industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 74, p. 1477-1482. 2019.

ROCHA, P. M. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC UFPEDA 438 utilizando melaço de cana como substrato**. Dissertação (Engenharia química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

ROCHA, P. M.; MENDES, A. C. S.; JÚNIOR, S. D. O.; PADILHA, C. E. A., LEITÃO, A. L. O. S., NOGUEIRA, C. C., MACEDO, G. R., SANTOS, E. S. Kinetic study and characterization of surfactin production by *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 using sugarcane molasses as carbon source. **Preparative biochemistry and biotechnology**. p. 1-9, 2020.

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Ann. Microbiol.** v. 64, p. 891-898, 2014.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 401-430, 2016.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinas por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 148p. 2007.

SECATO, Juliana; COELHO, Diego; ROSA, Nathalia; LIMA, Lucas; TAMBOURGI, Elias Basile. 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>.

SHALIGRAM, N. S.; REKHA, S. S. Surfactin – A review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. **Food Technol. Biotechnol**, vol 48, p. 119-134. 2010.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, New York, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SIMIQUÉLI, A. P. R. **Produção contínua de surfactina utilizando manipueira como substrato e estudo de sua aplicação em conjunto com óleos essenciais**. Tese (Ciências de alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2014.

SOUSA, M. **Bioconversão do glicerol para produção de biossurfactantes: aplicação no preparo de emulsões**. Dissertação (Engenharia química). Universidade Federal do Ceará, 2011.

SUWANSUKHO, P.; RUKACHISIRIKUL, V.; KAWAI, F; H-KITTIKUN, A.; Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. Songklanakarin **J. Sci. Technol.**, ed.30, pg. 87-93, 2008.

SU, Yuan; LIU, Chuan; FANG, Huan; ZHANG, Dawei. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, v. 19, n. 1, p. 1-12, 3 set. 2020. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>.

TOREN, A.; SEGAL, G.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Structure-Function Studies of the Recombinant Protein Bioemulsifier AlnA. **Environmental of Microbiology**, v.4, n.5, p. 257-261, 2002.

VALPUESTA, Rayane Rodrigues Fonseca. **Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria prima renovável de baixo custo**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Dissertação de mestrado, 140 p., 2008

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Res. J. Microbiol.**, v. 10, p. 181–192, 2015.

WANG, T., LINAG, Y., WU, M., CHEN, Z., LIN, J., YANG, L., 2015. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. **Chin. J. Chem. Eng.** 23, 744e754.

WEI, Y. H.; WANG, L. F.; CHANG, J. S.; KUNG, S. S. Identification of Induced Acidification on Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 174-178, 2003.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5:13, 2012.

ZANOTTO, A. W., VALÈRIO, A., ANDRADE, C. J.; PASTORE, G. M. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the Discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 130, p. 8647-8656, 2019.

ZHANG, J., XUE, Q., GAO, H., LAI, H., WANG, P. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 168, 2016.