

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARILIA GATO MARIM

**OBTENÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *BACILLUS SUBTILIS*
ATCC (9372) A PARTIR DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2014

MARILIA GATO MARIM

**OBTENÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *BACILLUS SUBTILIS*
ATCC (9372) A PARTIR DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Vanin dos Santos Lima

CAMPO MOURÃO

2014



TERMO DE APROVAÇÃO

**OBTENÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *BACILLUS SUBTILIS*
ATCC (9372) A PARTIR DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

POR

MARILIA GATO MARIM

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 19 de dezembro de 2014 às 15:30 horas como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi argüida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof^a. Dr^a. Mirela Vanin dos Santos Lima
Orientadora

Profa. Dr^a. Ailey Aparecida Coelho Tanamati
Membro da banca

Prof. Dr. Manuel Salvador Vicente Plata Oviedo
Membro da banca

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR *Campus* Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por ter me dado força, sabedoria, paciência e perseverança para alcançar mais esse objetivo.

De forma especial, agradeço aos meus pais pelo apoio incansável, o amor incondicional e confiança, que mesmo à distância conseguiram me direcionar e consolar em todos os momentos em que precisei.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mirela Vanin, por acreditar no meu trabalho, pelo incentivo, pelas soluções, pelo direcionamento durante o trabalho e apoio durante as decisões mais difíceis do último ano.

Aos companheiros de sala, André, Gustavo, Camarão, Math, Du, Rodrigo, Amanda, Jéssica, Fernanda, Tânia, Mari, Cláudia, Juliana, Eloísa, pela companhia, paciência, amizade, troca de conhecimentos, aprendizado e risadas.

Agradeço também aos minhas queridas amigas Alini, Ana Gabriela e Rayssa que conheci durante esta caminhada e que sempre estiveram ao meu lado participando das minhas tristezas, angústias e ansiedades nos momentos mais delicados. Agradeço por todos os momentos de amizade vividos e conquistados com fidelidade.

Ao meu namorado, Rodrigo Diniz, pelo carinho, sinceridade e encorajamento.

À toda minha família, que de forma indireta ou direta fizeram parte dessa conquista. Em especial, minha irmãzinha pela alegria e companhia.

Ao professor Evandro Bona e Mestranda Franciele Viel pela orientação e correções na parte estatística do trabalho.

As empresas Clean-Up Brazil e Usaçúcar - Usina Santa Teresinha pelo fornecimento de materiais utilizados neste trabalho.

Agradeço a Grasieli, Fernando e Adenilson pela valiosa ajuda durante os experimentos, que não mediram esforços de dia e de noite, com sol ou chuva.

Agradeço ao pessoal do estágio, Grupo JBS - Barretos, pelo aprendizado, pelas manhãs alegres e pela paciência ao aturarem minha inquietação vésperas da defesa.

Por fim, agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela acessibilidade e qualidade de ensino.

RESUMO

MARIM, Marília Gato. **Obtenção de biossurfactante por *Bacillus Subtilis* ATCC (9372) a partir de melaço de cana-de-açúcar.** 2014. 51 f. (Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Engenharia de Alimentos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Surfactantes são moléculas anfífilas capazes de interagir com líquidos de diferentes características como misturas apolares e polares e reduzir a tensão superficial na interface líquido/ar, apresentando assim aplicação em diversas áreas. A preocupação com a preservação do meio ambiente tem impulsionado pesquisas no sentido de obter produtos e processos menos poluentes. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a obtenção e caracterização de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* como biocatalisador do processo e melaço de cana de açúcar como meio de cultura. A metodologia de pesquisa utilizada, para avaliar os efeitos significativos sobre quantidade de biossurfactante e biomassa produzida, foi a técnica de planejamento experimental Box-Behnken com três fatores de estudo: pH; concentração de inóculo inicial e porcentagem de suplementação. O meio fermentativo, solução de melaço, foi clarificado, esterilizado, e teve seu pH ajustado, bem como, sua suplementação e inoculação com *Bacillus subtilis*, de acordo com o planejamento experimental proposto. A fermentação ocorreu sob agitação orbital de 150 rpm durante 144 horas, à temperatura de 35°C. Após a fermentação o biossurfactante foi recuperado do meio de fermentação utilizando-se: centrifugação, precipitação com solvente metanol e seco em estufa. Para avaliar o processo fermentativo, bem como a influência das variáveis de estudo no processo fez-se análises de AR, ART, °Brix, pH e biomassa, no início e ao final da fermentação; também fez-se a quantificação em massa do biossurfactante recuperado e seco. O biossurfactante obtido foi caracterizado através do índice de emulsificação e leitura em IR. Os resultados mostraram que na faixa de valores estudada o pH e a porcentagem de inóculo inicial não interferiram significativamente na produção da biomassa, mas a suplementação favoreceu o crescimento do microrganismo. Pode-se observar também que os três fatores estudados influenciaram na produção do biossurfactante sendo que a suplementação interferiu de forma positiva, assim como para a biomassa. Através do índice de emulsificação pôde-se observar a formação de camada emulsificada na interface biossurfactante/óleo de soja, indicando a capacidade emulsificante do biossurfactante obtido; e através do IR pode-se sugerir que o biossurfactante obtido é a surfactina.

Palavras-chave: Biossurfactante. Planejamento estatístico. *Bacillus subtilis*. Fermentação. Melaço de cana-de-açúcar.

Abstract

MARIM, Marília Gato. **Obtaining of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ATCC 9372 from sugar cane molasses.** 2014. 51 f. (Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Engenharia de Alimentos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014.

Surfactants are amphiphilic molecules capable of interacting with fluids of different characteristics such as polar and nonpolar mixtures, and capable of reducing the surface tension at the liquid / air interface; due to that fact it presents application in several areas. The concern with the environment preservation has driven researches with the objective of getting less pollutant products and processes. Thus, this work aimed to study the obtaining and characterization of the biosurfactant produced by the *Bacillus subtilis* as a biocatalyst process and sugar cane molasses as a means of culture. The research methodology used to assess the significant effects on the amount of biomass and biosurfactant produced was the Box-Behnken experimental design technique with three study factors: pH; initial inoculum concentration and percentage of supplementation. The means of fermentation, molasses solution, was purified, sterilized and had its pH adjusted, as well as its supplementation and inoculation with the *Bacillus subtilis*, according to the experimental design proposed. Fermentation took place under an orbital shaking of 150 rpm for 144 hours at a temperature of 35 ° degrees Celsius. After fermentation the biosurfactant was recovered from the means of fermentation using up centrifugation, precipitation with methanol solvent and an oven for drying. To evaluate the fermentation process, and the influence of the study variables in the process AR, ART, ° Brix, pH and biomass analyses were performed at the beginning and at the end of the fermentation; the quantification in mass of the biosurfactant recovered and dried was also made. The biosurfactant obtained was characterized by the emulsifying index reading in IR. The results showed that the range of investigated pH values and the percentage of the initial inoculum did not influence significantly the production of the biomass, but the supplementation promoted the growth of the microorganism. It may also be noted that the three factors studied influenced the biosurfactant production and that the supplementation interfered positively, as well as the biomass. Through the emulsification index it was possible to observe the formation of the emulsified layer in the biosurfactant interface/ soybean oil, indicating the emulsifying capacity of the biosurfactant obtained; and through the IR it can be suggested that the biosurfactant obtained is surfactin.

Key words: Biosurfactant. Statistical Planning. *Bacillus subtilis*. Fermentation. Sugar cane molasses.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos biossurfactantes produzidos por diferentes microrganismos.....	14
Tabela 2– Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento	22
Tabela 3 - Resultados das determinações analíticas: início e final da fermentação.	27
Tabela 4 – Resultados dos fatores de conversão de substrato em células.....	30
Tabela 5 - Parâmetros utilizados para fator de conversão de Substrato em Produto.	30
Tabela 6 - Produtividade em (g/L.h) de cada ensaio produzido.	31
Tabela 7- Matriz do planejamento Box-Behnken com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de Biomassa (g/L).....	32
Tabela 8 - Coeficientes de regressão para a Biomassa (g/L).....	33
Tabela 9 - ANOVA do modelo quadrático para predição da Biomassa (g/L).	34
Tabela 10 - Matriz do planejamento Box-Behnken com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de Biossurfactante (g/L).....	35
Tabela 11 - Coeficientes de regressão para a Biossurfactante (g/L).....	36
Tabela 12 - ANOVA do modelo quadrático para predição da Biossurfactante (g/L)..	37
Tabela 13 - Atividade Emulsificante (%) de emulsão formada em óleo, querosene e heptano.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i>	15
Figura 3 -Preparo do substrato (1) sem ultrafiltração e tratamento (2) com ultrafiltração.....	26
Figura 4 - Curva de contorno para a biomassa em função da concentração de inóculo e da suplementação, fixo em pH 6 (ponto central).....	35
Figura 5 -Curva de contorno para o biossurfactante em função da concentração de inóculo e do pH, com suplementação fixa no ponto central (0,5%).....	38
Figura 6 - Curva de contorno para o biossurfactante em função da suplementação e do pH, com concentração de inóculo fixa no ponto central.	39
Figura 7 - Curva de contorno para o biossurfactante em função da concentração de inóculo e da suplementação ancorada em pH do ponto central.....	40
Figura 8 - Atividade Emulsificante com óleo (9-6-5-3).....	41
Figura 9 - Atividade emulsificante com querosene (9-6-5-3).....	42
Figura 10 - Atividade Emulsificante com heptano (9-6-5-3).	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Classificação e natureza química dos biossurfactantes	14
3.2 Produção de biossurfactante a partir de <i>Bacillus subtilis</i>	16
3.3 Condições e Meio de Cultivo.....	16
3.4 Aplicações dos biossurfactantes	17
4. METODOLOGIA.....	19
4.1 Preparo do Meio de Cultura	19
4.2 Microorganismo.....	20
4.3 Ativação e Manutenção do Microorganismo	20
4.4 Planejamento experimental.....	21
4.5 Produção do Biossurfactante	22
4.6 Determinações analíticas	23
4.7 Processo de Extração do Biossurfactante.....	24
4.8 Caracterização do Biossurfactante	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Caracterização do substrato	26
5.2 Caracterização do inóculo.....	26
5.3 Determinações analíticas: início e término da fermentação	27
5.4 Cálculo dos fatores de conversão e produtividade.....	29
5.4.1 Fator de Conversão de Substrato em Células (g/g)	29
5.4.2 Fator de Conversão de Substrato em Produto $Y_{P/S}$	30

5.4.3 Produtividade	31
5.5 Análise dos resultados das variáveis dependentes (biomassa e biossurfactante) em função do planejamento experimental proposto.	32
5.5.1 Biomassa	32
5.5.2 Biossurfactante (g/L)	35
5.6 Determinação da Atividade Emulsificante	40
5.7 Análise de Infravermelho.....	42
6. CONCLUSÃO.....	45
7. SUGESTÕES	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfifílicas ou anfipáticas, contendo duas frações distintas: apolar (hidrofóbica) e polar (hidrofílica). Por esta razão, os surfactantes possuem a capacidade de interagir com líquidos de diferentes características como misturas apolares e polares e formar na superfície uma película ou filme, capaz de reduzir a tensão superficial na interface líquido/ar (ZANA, 2005). Essas características conferem aos surfactantes diversas possibilidades de aplicação para uso doméstico ou industrial, tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (SOBRINHO, 2007).

Os surfactantes mais usados atualmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo, embora o interesse em biossurfactantes, que são de origem microbiológica, tem aumentado nos últimos anos devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade (FONSECA et al., 2007). A busca de alternativas limpas para desenvolvimento de produtos e processos é uma área de interesse no âmbito industrial, devido à preocupação ambiental combinada com as novas legislações de controle do meio ambiente (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; CORTEZ e ROBERTO, 2008).

Os biossurfactantes, diferentemente dos surfactantes sintéticos, apresentam propriedades de ação específica, e maior tolerância às condições ambientais (pH, força iônica, temperatura), o que colabora para seu uso preferencial em aplicações mais nobres. Entretanto, estes não são ainda amplamente utilizados pela indústria, devido a seu alto custo de produção. Assim, tem se buscado soluções viáveis economicamente através do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo (NITSCHKE e PASTORE, 2003).

A produtividade e estrutura química de um biossurfactante não dependem apenas do microrganismo utilizado. Um dos fatores mais críticos para o crescimento microbiano é a fonte de carbono, que pode estar na forma solúvel (açúcar e álcool, por exemplo) em água ou insolúvel, como os óleos vegetais. Além da fonte de carbono, elementos vestigiais, temperatura, oxigênio e pH, também podem promover mudanças na estrutura química da molécula, e, conseqüentemente, alterar suas características físico-químicas (CARA, 2009).

As propriedades físicas e químicas de um biossurfactante servem de parâmetro para avaliação de desempenho como a capacidade de reduzir a tensão superficial, capacidade espumante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas, solubilidade e poder detergente (MULLIGAN, 2005).

Existe uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos que são capazes de produzir biossurfactantes com grande diversidade estrutural, porém a maioria é produzida por bactérias. Algumas espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas pela sua capacidade de produzir compostos com propriedades tensoativas, dentre estes, destaca-se a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, considerada como um dos mais potentes biossurfactantes já conhecidos (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

Considerando que o Brasil é um país essencialmente agrícola, a quantidade e a facilidade de acesso aos subprodutos agroindustriais são altas e por isso pesquisadores aderem ao uso de fontes alternativas de meios de cultura como cana-de-açúcar, melaço, água de milho, e resíduos de efluentes (NEVES, 2007). O melaço, por exemplo, é um subproduto da indústria de açúcar tanto utilizado como fonte de carbono para alimentação de animais, biofertilizantes e também como matéria-prima para a indústria de fermentações (VALPUESTA, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral obter e caracterizar biossurfactante resultante da fermentação empregando *Bacillus subtilis* como biocatalisador do processo, e resíduo da agroindústria como meio de cultura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência das variáveis de processo: concentração de biomassa, suplementação do meio e pH, na obtenção do biossurfactante;
- Elaboração de planejamento experimental para o delineamento dos experimentos (fermentações);
- Determinar a concentração de biomassa;
- Determinar de forma qualitativa a obtenção do biossurfactante;
- Apresentar resultado estatístico acerca do planejamento experimental proposto, indicando a melhor combinação das variáveis avaliadas para a obtenção do biossurfactante;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Classificação e natureza química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são um grupo heterogêneo de moléculas de superfície ativa produzidos por leveduras, fungos e bactérias. Uma extensa variedade de biossurfactantes é atualmente conhecida e a classificação é feita de acordo com suas estruturas químicas e origem microbiana (MAIER, 2003).

As principais classes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. (ROCHA, 2007). A origem microbiana e os tipos dos biossurfactantes estão descritos na Tabela 1 de acordo com a classificação de baixa massa molecular e alta massa molecular.

Tabela 1 - Classificação dos biossurfactantes produzidos por diferentes microrganismos.

Classe	Biossurfactante	Microrganismos
Baixa massa molecular	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i>
	Trealolipídios	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Soforolipídios	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Torulopsis bombicola</i>
	Celobioselipídios	<i>Ustilva maydis</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. papumilis</i>
	Fosfolipídios	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Acidithio bacillus thiooxidans</i>
	Lipopeptídios	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. papumilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. fluorescens</i>
	Flavolipídios	<i>Flavobacterium sp.</i>
	Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Alta massa Molecular	Alasan	<i>Acinetobacter redioresistens</i>
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: Cara (2009).

As culturas de *Bacillus subtilis* produzem um lipopeptídeo cíclico conhecido como surfactina ou subtilisina conforme Figura 1, considerado dentre os biossurfactantes conhecidos um dos mais potentes. Em termos estruturais, sua molécula é composta de um heptapeptídeo cíclico (Glu-Leu-Dleu-Val-Asp-DLeu-Leu)

ligado a uma molécula de ácido graxo β -hidróxi contendo de 13 a 15 átomos de carbono (BARROS et al., 2007).

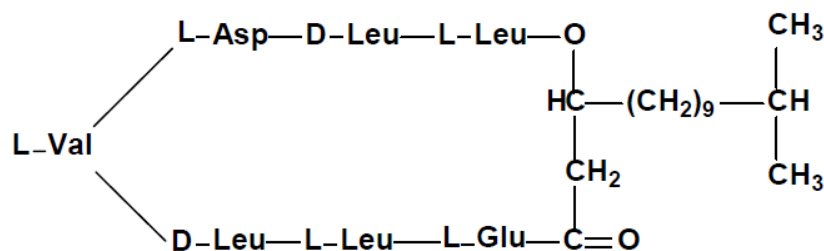


Figura 1 - Estrutura da surfactina produzida por *Bacillus subtilis*.

Fonte - (NITSCHKE; PASTORE, 2003).

Apesar da grande diversidade estrutural, os biossurfactantes, apresentam alguns aspectos em comum, como (NITSCHKE e PASTORE, 2003; REIS, SÉRVULO, FRANÇA, 2004):

- Baixa toxicidade - os biossurfactantes são moléculas naturais e, comprovadamente, não causam danos aos seres vivos estruturalmente mais complexos (plantas e animais), embora alguns possam ter ação antimicrobiana;
- Biodegradabilidade - são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para diferentes aplicações ambientais;
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica - são moléculas naturalmente produzidas por microrganismos em diferentes condições ambientais para exercer diferentes funções;
- Disponibilidade: podem ser produzidos de matérias-primas largamente disponíveis, além da possibilidade de serem produzidos a partir de resíduos industriais;
- Especificidade: por apresentarem grupos funcionais específicos se enquadram em diversas ações específicas;
- Biocompatibilidade e digestibilidade: garante a aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

3.2 Produção de biossurfactante a partir de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis são distinguidas como bactérias gram-positivas, formadoras de esporos, produtoras de ácidos e álcoois e anaeróbias facultativas (PARREIRA, 2009). Vários trabalhos relatados na literatura descrevem a eficiência da produção de biossurfactantes por isolados de *Bacillus subtilis* cultivados sob diversas condições físicas e químicas.

Wei et al. (2003) obtiveram produção de 3,5 g/L de surfactina com crescimento de *Bacillus subtilis* em glicose suplementada com ferro. Neste trabalho, verificaram que o excesso de ferro acidificou o meio, diminuindo a produção do biossurfactante.

Nitschke e Pastore (2004) alcançaram uma concentração de 3,0 g/L de biossurfactante também produzido por *Bacillus subtilis*, utilizando-se como substrato a manipueira, efluente do processamento de mandioca.

Valpuesta (2008) utilizou *Bacillus subtilis* isolado para a produção de biossurfactante e adotou um planejamento experimental fatorial 3^2 , para estudar as variáveis independentes relação carbono/nitrogênio (3, 9 ou 15) e agitação (50, 150 ou 250 rpm), que indicou como melhores condições a relação C/N de 3 e agitação de 250 rpm.

3.3 Condições e Meio de Cultivo

Devido à alta disponibilidade e baixo custo, subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento microbiano. O melaço, por exemplo, destaca-se como meio de cultivo nos processos fermentativos, em virtude do alto teor de açúcares, nitrogênio e vitaminas. Cerca de 17,9 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil durante a fabricação do açúcar. Em virtude de sua composição rica em açúcares fermentescíveis, seu baixo custo e alta disponibilidade no território brasileiro, o melaço de cana-de-açúcar é sugerido como substrato para melhorar e reduzir custos na produção de biossurfactantes (HAULY et al., 2003).

Dentre os fatores que influenciam a natureza química e a concentração de biossurfactante produzido está o microrganismo utilizado, a fonte de carbono, as possíveis limitações nutricionais envolvidas no crescimento microbiano, além de

fatores abióticos, como pH, temperatura, agitação e aeração. Deste modo, modelos para a produção de biossurfactantes por diferentes espécies de bactérias devem ser otimizados caso a caso (PACHECO, 2008).

A literatura aponta para uma diversidade de estudos que utilizaram diferentes meios para produzir biossurfactantes. A seguir são descritos alguns trabalhos publicados.

Reis, Sérvulo e França (2004) analisaram o efeito de diferentes fontes de carbono (20 g/L) - açúcar cristal, caldo de cana, vinhoto, glicerol, manitol e óleo de soja – no crescimento celular e na mudança da tensão superficial do meio de cultura por *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Todas as fontes de carbono utilizadas foram favoráveis ao crescimento e produção de biossurfactante, embora os valores máximos tenham sido obtidos para o açúcar cristal. O melaço favoreceu o crescimento celular e a produção de biossurfactante, provavelmente pelo fato do subproduto da indústria açucareira conter alguns elementos (sais e aminoácidos) que favorecem o crescimento celular. Segundo os autores, a produção de biossurfactante e o crescimento celular não foram influenciados pelo pH inicial do meio na faixa de 5,5 a 8,5.

Pacheco (2008) realizou um planejamento experimental fatorial fracionado para a produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis*, variando: concentração de Glicerol (10, 20 ou 30 g/L), Nitrato de Sódio (1; 3,4 ou 5,8 g/L), Cloreto de Sódio (0, 1 ou 2g/ L), Sulfato de Magnésio (0; 0,1 ou 0,2 g/L), Cloreto Férrico (0; 0,01 ou 0,02 g/L), Cloreto de Cálcio (0; 0,02 ou 0,04 g/L), Extrato de Levedura (0; 0,1 ou 0,2 g/L), totalizando 16 experimentos acrescidos de 4 pontos centrais. Os fatores que influenciaram positivamente as variáveis e respectivos valores ideais foram: Glicerol (10 g/L), Nitrato de Sódio (1 g/L) e Extrato de Levedura (0,2 g/L).

3.4 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são produzidos por processos fermentativos, por isso são mais brandos do que os processos químicos tradicionalmente envolvidos na produção de surfactantes. Além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (KITAMOTO, 2002).

Sua aplicação está tanto na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas quanto na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, vestuário, processamento de alimentos, tratamento e processamento de metais, processamento de polpas de papel, entre outros (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA; 2000).

No ramo alimentar, os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes de gorduras e no processamento de matérias-primas, na panificação e em produtos derivados de carne. Também podem auxiliar na formação da consistência e textura, como na dispersão de fases e na solubilização de aromas dos alimentos (MUTHUSAMY et al, 2008).

Apesar das inúmeras vantagens relatadas para os biossurfactantes, a sua aplicação em larga escala é ainda limitada, devido ao seu alto custo de produção, sendo, portanto, a busca de resíduos de baixo custo para aplicações potenciais. De todas as áreas de aplicação, a que está mais desenvolvida é a ambiental, uma vez que os biossurfactantes aceleram a degradação microbiana de vários óleos, pois aumentam a interação interfacial água-óleo e, assim, promovem a biorremediação de águas e solos contaminados (MULIGAN, 2005).

4. METODOLOGIA

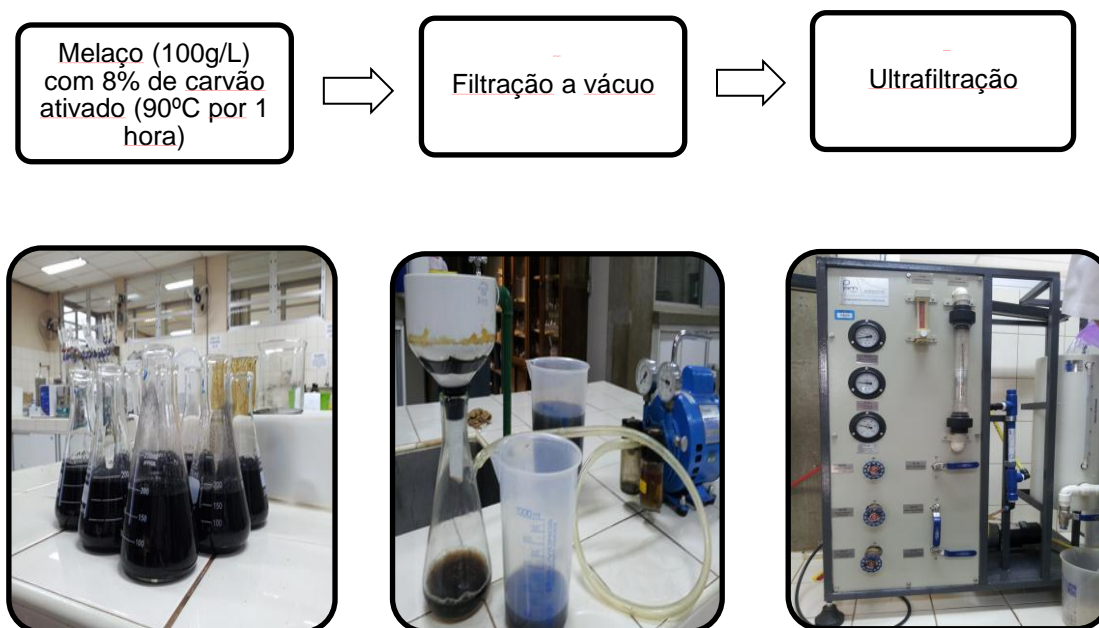
4.1 Preparo do Meio de Cultura

O substrato principal empregado no meio de cultura foi o melaço de cana-de-açúcar, doado pela empresa USAÇÚCAR - Usina Santa Teresinha, localizada na cidade de Maringá em fevereiro de 2014.

De acordo com a CNNPA nº 12/78 da ANVISA, o melaço é definido como líquido que se obtêm como resíduo de fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto. Dessa forma, este subproduto apresenta uma coloração bastante escura (quase preto) havendo a necessidade de ser tratado por clarificação a fim de que a coloração escura não altere ou atrapalhe o processo fermentativo.

De acordo com Valduga (2005), o pré-tratamento mais adequado para clarificação do melaço é o realizado com 8% de carvão ativo por 1 hora sob agitação à 90°C, seguido de centrifugações, filtração em papel e membrana de acetato de celulose de 0,8 a 0,2 µm.

Então, tomando por base o trabalho de Valduga (2005) preparou-se uma solução aquosa de melaço na concentração de 100 g/L e adicionou-se 8% de carvão ativado em pó. Após, o sistema foi aquecido à 90°C durante 1 hora com agitação para total interação do melaço com o carvão. Em seguida, a solução de melaço com o carvão foi resfriada e filtrada a vácuo, três vezes com filtro de 120 mm. Finalmente, para retirar totalmente os resíduos de carvão utilizou-se o método de Ultrafiltração por Membrana (Módulo de Membrana-Pam). A solução de melaço clarificada e filtrada foi colocada em potes de vidro com tampa, e então esterilizados à 121°C e 1atm por 15 min.; por fim armazenados em geladeira à 5°C. O esquema ilustrativo do preparo do substrato pode ser acompanhado no Fluxograma 1.



Fluxograma 1- Etapas de clarificação do melaço de cana-de-açúcar por filtração e ultrafiltração.

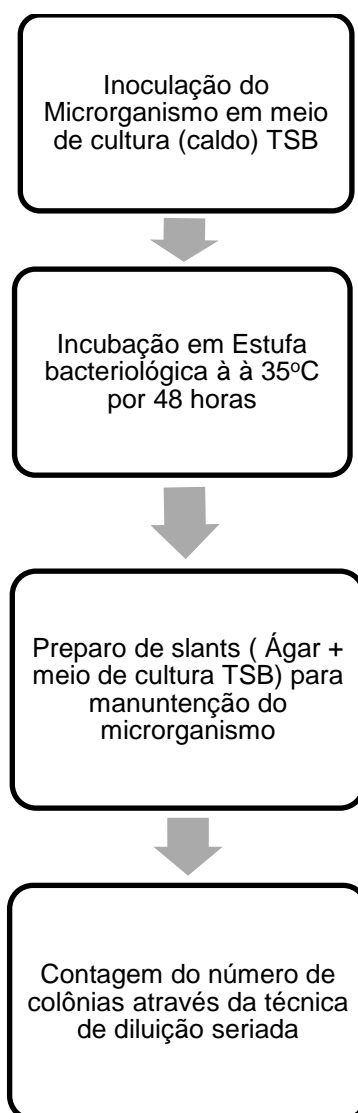
Para caracterizar o substrato, foram feitas análises de açúcares redutores (AR), açúcares redutores totais (ART), pH e teor de sólidos solúveis (°Brix), determinadas segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.2 Microorganismo

A bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 9372 (*Bacillus atrophaeus* var. *subtilis*) utilizada para obtenção do biossurfactante foi cedida em fevereiro de 2014 pela empresa Clean-up Brazil Biotecnologia, localizada na cidade de Campo Mourão – PR, na forma de uma tira de papel/suporte onde o microorganismo encontra-se seco e esporulado.

4.3 Ativação e Manutenção do Microorganismo

Para ativar, manter e padronizar o microorganismo (*Bacillus subtilis*) que se encontrava na forma de esporos secos, fez-se o procedimento conforme Fluxograma 2. O procedimento mais detalhado encontra-se no Anexo I.



Fluxograma 2 - Procedimento realizado para ativação, manutenção e caracterização do *Bacillus subtilis* ATCC 9372.

4.4 Planejamento experimental

O planejamento experimental representa uma metodologia na qual um conjunto de ensaios é estabelecido, com base em critérios estatísticos, determinando a influência de diferentes fatores nos resultados de um processo.

Neste sentido, para avaliar o efeito do pH, da concentração inicial de inóculo e da suplementação com extrato de levedura e peptona, na obtenção do biossurfactante pelo *Bacillus subtilis*, a técnica de planejamento experimental Box-Behnken com três fatores de estudo foi empregada. As variáveis estudadas foram pH (X1), concentração de inóculo (X2) e suplementação (X3), onde cada variável apresentou dois níveis, superior (+1) e inferior (-1) além de pontos centrais (0). Os

níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento estão apresentados na Tabela 2. Todos os ensaios do planejamento foram realizados aleatoriamente. As respostas avaliadas (variáveis dependentes) foram aumento de biomassa (g/L) e biossurfactante (g/L).

Tabela 2– Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento

VARIÁVEIS	Níveis reais e codificados		
	-1	0	1
X1 pH da reação	5,0	6,0	7,0
X2 Inóculo (% V/V)	1,0	1,5	2,0
X3 Suplementação (% m/V)	0	0,5	1,0

Toda análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA). Para avaliar o efeito das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes (respostas) a metodologia de superfície de resposta foi aplicada. A análise de variância foi utilizada para avaliar a adequação dos modelos que foram ajustados a partir da Equação 1.

$$y(X_1, X_2) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Onde y é a resposta esperada, β_0 é uma constante, β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} são os coeficientes da regressão e X_1 , X_2 , são os níveis de variáveis independentes.

4.5 Produção do Biossurfactante

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de meio de cultura composto pela solução de melação clarificada na concentração 100 g/L, conforme descrito no item 3.1. O meio de cultura foi inoculado com a solução de inóculo (descrito no item 3.3), ajustado o pH e adicionado os suplementos (extrato de levedura e peptona) de acordo com o planejamento experimental proposto. Para determinação de biomassa (massa seca) foi retirada uma amostra de 10 mL e após os frascos foram mantidos fechados sob agitação orbital de 150 rpm durante 144 horas, à temperatura de 35°C em Banho Termostático Agitado MOD-DI – 950 M. A Figura 2 mostra como foi realizado a batelada de fermentação no Banho Termostático.



Figura 2 - Fermentação realizada em Banho Termostático agitado à 35°C.

4.6 Determinações analíticas

As determinações analíticas foram realizadas no início e ao término da fermentação, conforme normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

- pH: determinado em pHmetro de Bancada Digital 0/14 Ph (TecnoPON) calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.
- Sólidos Solúveis Totais (°Brix): determinados em refratômetro marca AUS-JENA.
- Concentração de Açúcares Redutores (AR): determinada através da construção da curva de calibração de AR, empregando-se a metodologia de DNS (MALDONE; CARVALHO; FERREIRA, 2013), onde para tanto foi necessário preparar o reagente DNS (ácido dinitrosalicílico), solução de tartarato duplo de sódio e potássio e solução padrão de glicose a 1,0 g/L. A partir da solução padrão de glicose foram preparadas soluções diluídas com concentrações conhecidas. Após o preparo das soluções 1mL de cada solução foi adicionada em um tubo de ensaio, então adicionado 1 mL do reagente de DNS. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho-maria a 100°C (em ebulição) por 5 minutos. Após, os mesmos foram resfriados em banho com gelo por 5 minutos e adicionou-se 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio, assim, foram homogeneizados e então realizada a

leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (OCEAN OPTICS, UV-RED TIB USB 650 UV) à 540 nm. O branco constituiu em substituir o volume de solução de glicose por água. Com as leituras de absorbância para as várias concentrações preparadas foi possível construir uma curva de calibração de concentração de açúcar redutor (AR) por absorbância, obtendo-se uma correlação linear através do programa Microsoft Excel versão 7.0. Por conseguinte, gerou-se a equação da reta a qual foi utilizada para a determinação da concentração de açúcar redutor nos meios de cultura antes e após a fermentação. Para o preparo das amostras retirou-se uma alíquota de 10 mL do caldo de fermentação, que foi centrifugado; o precipitado foi utilizado para determinação de biomassa seca e do sobrenadante retirou-se 1,0 mL para a determinação de AR por DNS.

- Concentração de açúcares redutores totais (ART): foi obtida após inversão ácida da sacarose presente no caldo, onde retirou-se 2,0 mL do sobrenadante obtido no item anterior e adicionou a este 2,0 mL de HCl 2 mol/L, após foi aquecido em Banho Maria em ebulição por 10 minutos. Então o sistema foi resfriado em banho de gelo e acrescentado 2,0 mL de NaOH 2 mol/L e homogeneizado. Em seguida foi centrifugado e filtrado. Então, 1 mL do filtrado foi utilizado para o teste de DNS, conforme descrito anteriormente.
- Determinação de biomassa (massa celular seca): para este fim foi utilizado o precipitado obtido no item de determinação de AR, proveniente da centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. O tubo da centrífuga foi seco, resfriado em dessecador e pesado vazio. Após a centrifugação a massa foi lavada com água destilada e centrifugada, duas vezes. Então o tubo foi colocado em estufa a 60°C para a secagem da biomassa, este sistema foi resfriado em dessecador e pesado periodicamente até peso constante. A massa celular seca foi calculada pela diferença entre a massa do tubo com biomassa seca e a massa do tubo vazio.

4.7 Processo de Extração do Biossurfactante

O biossurfactante foi recuperado do caldo fermentado segundo a metodologia sugerida por Sobrinho (2007), onde após 144 horas de cultivo, o líquido metabólico foi centrifugado a 4500 rpm durante 20 minutos para retirar as células e

submetido ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 mol/L e precipitado com 2 volumes de metanol (10 mL de amostra e 20 de metanol). Após repouso durante 24 horas a 0°C, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos, lavadas com metanol gelado por duas vezes e secas em estufa a 37°C por 48 horas, mantidas em dessecador até peso constante, sendo o rendimento em produto isolado, calculado em g/L.

4.8 Caracterização do Biossurfactante

- Determinação da Atividade Emulsificante: a atividade emulsificante (E_{24}) foi realizada em tubos com tampa rosca contendo 4 mL de solução aquosa na concentração de 1 mg/mL de biossurfactante adicionados de 6 mL de hidrocarbonetos: hexano, óleo de soja e querosene. Cada tubo foi homogeneizado em “vortex” (modelo QI-901 – Biomixer) por 2 minutos e deixado em repouso por 24 horas. O índice de emulsificação foi determinado ao medir a altura da camada emulsionada (cm) e dividindo-a pela altura total de líquido x 100 (BUENO; SILVA; CRUZ, 2010).
- FTIR: Segundo Makkar e Cameotra (1999), realizou-se a caracterização química do biossurfactante através da técnica da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (TFIR) na faixa de 4000-400 cm^{-1} em espectrofotômetro Shimadzu IR Affinity¹. Uma amostra de 0,1 mg do biossurfactante foi devidamente misturada a 100 mg de Brometo de Potássio (KBr), macerada e prensada na forma de pastilha para então ser realizada a leitura no FTIR.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do substrato

Após o processo de ultrafiltração realizado no substrato (solução de melão), pode-se comparar a eficiência do método conforme a Figura 3. O resultado obtido permaneceu de acordo com os resultados obtidos por Valduga (2005), podendo sugerir em clarificações em grandes volumes, pois resultou em alta eficiência e capacidade de clarificar sem a necessidade do uso de substâncias químicas.



Figura 2 -Preparo do substrato (1) sem ultrafiltração e tratamento (2) com ultrafiltração.

5.2 Caracterização do inóculo

Para a caracterização e padronização do inóculo empregou-se a metodologia descrita no item 3.3.

Como resultado da média das duplicatas referentes à contagem de colônias nas placas de diluição seriada obteve-se $6,7 \times 10^8$ UFC/mL de *Bacillus subtilis*.

Segundo Gomes (2013) o *B. subtilis* produz colônias irregulares (contorno ondulado ou filamentoso), consistência cremosa e de diâmetro entre 2 e 4 mm. Na caracterização do inóculo, constatou-se essas características no crescimento do *B. subtilis*, e também pôde-se observar colônias típicas de coloração alaranjada.

5.3 Determinações analíticas: início e término da fermentação

Os resultados das determinações analíticas (pH; °Brix; AR; ART e biomassa) obtidos no início e ao término da fermentação podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das determinações analíticas: início e final da fermentação.

N*	pH _i	pH _f	Brix ^o _i	Brix ^o _f	AR _i (g/L)	AR _f (g/L)	ART _i (g/L)	ART _f (g/L)	[MO] _i (g/L)	[MO] _f (g/L)
1	5	4,4	8,00	7,75	5,50	2,72	23,21	19,63	0,58	1,68
2	7	4,16	8,00	7,25	5,50	2,16	23,21	24,80	0,57	1,79
3	5	4,19	8,00	7,75	5,50	3,66	23,21	21,95	0,86	2,17
4	7	4,2	8,00	8,25	5,50	1,96	23,21	19,63	0,57	1,69
5	5	4,15	8,00	7,5	5,50	4,63	23,21	24,80	0,63	1,83
6	7	4,37	8,00	7,00	5,50	4,44	23,21	25,20	0,60	1,89
7	5	4,34	8,00	9,00	5,50	1,92	23,21	20,29	0,77	2,96
8	7	4,46	8,00	8,75	5,50	1,48	23,21	27,46	0,86	2,97
9	6	4,41	8,00	6,00	5,50	3,24	23,21	25,92	0,69	2,05
10	6	4,75	8,00	5,75	5,50	2,79	23,21	25,26	0,54	1,62
11	6	4,47	8,00	10,0	5,50	2,01	23,21	21,82	0,74	3,01
12	6	4,29	8,00	10,0	5,50	1,03	23,21	22,52	0,66	2,37
13	6	4,28	8,00	7,00	5,50	2,41	23,21	19,21	0,63	2,03
14	6	4,22	8,00	7,00	5,50	3,47	23,21	24,20	0,69	2,09
15	6	4,3	8,00	8,00	5,50	2,43	23,21	19,36	0,66	2,01

*N = Número de experimentos. i = inicial e f = final

Analisando a Tabela 3 observou-se que o pH diminuiu em todos os experimentos mantendo-se numa faixa de pH final de 4 a 4,5.

Este resultado relativo ao decréscimo do pH durante a fermentação também foi observado por outros autores como Ciapina (2008) em seu estudo de produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis*, que verificou uma queda do pH do meio de cultura que continha glicerol como fonte de carbono, apesar do tamponamento, diminuindo de pH 7, no início do processo, para 4,5 – 5,0 após 2 dias.

Pirog et. al (2004) também relataram diminuição nos valores de pH do meio de cultura (de 7,0 para 5,3 – 5,5), tornando uma condição inibitória para o crescimento celular, quando utilizaram amônio como fonte de nitrogênio, independentemente da fonte de carbono utilizada.

Em suma, a acidificação do meio durante a fermentação pode ser causada devido ao melaço de cana-de-açúcar propiciar a formação de outros metabólitos

pelo microrganismo *Bacillus subtilis*, como ácidos orgânicos, que alteraram o pH do meio.

Em relação aos sólidos solúveis observou pela Tabela 3 que este diminuiu a partir de 8°Brix inicial para a maioria dos experimentos, sugerindo o consumo dos açúcares por parte do microrganismo durante a fermentação. Porém, é possível verificar que para alguns experimentos o °Brix medido se apresentou maior do que o inicial; como a determinação de °Brix foi realizada com refratômetro manual sugere-se erro de leitura ou de calibração do equipamento.

Em relação à concentração de açúcares redutores e açúcares redutores totais pode-se afirmar que havia uma concentração adequada para suprir as necessidades dos microrganismos durante o processo fermentativo visando o aumento de biomassa e a produção do biossurfactante.

Analisando a Tabela 3 observa-se que a concentração de AR diminuiu para todos os experimentos; porém a concentração de ART não. O ART variou na maioria dos experimentos, mas verifica-se que houve um aumento na concentração de ART para alguns experimentos. Esse resultado inadequado pode ter ocorrido em função de algum erro de análise, como por exemplo, na etapa de hidrólise ácida empregada para a obtenção de açúcares redutores totais que pode não ter sido adequada para a obtenção de um resultado correto; além disso, como resultado da hidrólise ácida tem-se o escurecimento da amostra, que também pode ter interferido na análise. Uma sugestão seria trocar a hidrólise ácida por hidrólise enzimática, a qual não altera a coloração da amostra, não interferindo assim na leitura de absorbância pelo método de DNS.

Outra possibilidade de interferência nos resultados seria a mistura da biomassa com o caldo depois da centrifugação, deixando o caldo mais turvo devido a suspensão do microrganismo, interferindo, assim, tanto nos resultados do °Brix quanto no ART. Também, uma possível causa dos resultados poderia ser em função do microrganismo ter produzido componentes solúveis (não avaliados no trabalho) que mascararam os verdadeiros resultados em alguns ensaios.

O decréscimo nas concentrações de AR e ART para a maioria das amostras corroboram o resultado do decréscimo da concentração de sólidos solúveis (°Brix).

A concentração de biomassa aumentou, afirmando que houve desenvolvimento do microrganismo, conforme demonstra os valores finais e iniciais

da biomassa na Tabela 3 onde por exemplo no ensaio 15 variou de 0,66 g/L para 2,01 g/L.

5.4 Cálculo dos fatores de conversão e produtividade

O êxito ou fracasso de um processo fermentativo tem relação direta com o microorganismo escolhido. Este deve apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto, permitindo o acúmulo do produto no meio, de forma a obter elevada concentração de metabólido do caldo fermentado (BEZERRA, 2006).

Os rendimentos são valores obtidos através do estudo do crescimento microbiano e da produção de metabólitos, e com estes resultados tem-se base para obter os fatores de conversão de substrato- microorganismo e substrato-produto.

5.4.1 Fator de Conversão de Substrato em Células (g/g)

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi definido através das relações apresentadas na Equação 2. E os valores para o cálculo encontram-se na Tabela 4.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{(S_i - S_f)} = \frac{[MO]_f - [MO]_i}{(AR_i - AR_f)} \quad (2)$$

Onde:

$Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células (g/g)

ΔX : variação da concentração celular (g/L)

ΔS : variação da concentração de substrato (g/L)

Tabela 4 – Resultados dos fatores de conversão de substrato em células.

Ensaio	(MO _f - MO _i)	(AR _f - AR _i)	Y _{X/S}
1	1,09	2,78	0,39
2	1,21	3,34	0,36
3	1,31	1,84	0,71
4	1,12	3,54	0,32
5	1,21	0,87	1,39
6	1,29	1,05	1,22
7	2,19	3,57	0,61
8	2,11	4,02	0,53
9	1,37	2,25	0,61
10	1,08	2,71	0,40
11	2,26	3,49	0,65
12	1,71	4,46	0,38
13	1,41	3,08	0,46
14	1,41	2,02	0,70
15	1,36	3,07	0,44

Observou-se que os maiores fatores de conversão de substrato em células foram 1,39 e 1,22 g microrganismos/ g AR (ensaios 5 e 6 respectivamente), demonstrando que o substrato foi facilmente assimilável, aumentando o número de células.

5.4.2 Fator de Conversão de Substrato em Produto Y_{P/S}

O fator de conversão de Substrato em Produto é definido através da relação da Equação 3, com resultados na Tabela 5.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{(\Delta S)} = \frac{P_f - P_i}{[AR_i] - [AR_f]} \quad (3)$$

Tabela 5 - Parâmetros utilizados para fator de conversão de substrato em Produto.

Ensaio	(AR _f - AR _i)	(P _f - P _i)	Y _{P/S}
1	2,78	1,08	2,57
2	3,34	1,20	2,79
3	1,84	1,39	1,32
4	3,54	1,32	2,68
5	0,87	1,55	0,56
6	1,05	2,07	0,51
7	3,57	3,54	1,01
8	4,02	3,65	1,10
9	2,25	1,27	1,78
10	2,71	1,17	2,32
11	3,49	2,78	1,25
12	4,46	2,93	1,52
13	3,08	1,77	1,75
14	2,02	1,77	1,14
15	3,07	1,77	1,73

Ao observar os valores de conversão de substrato em produto, nota-se que as maiores conversões foram nos ensaios 1, 2 e 4, com 2,57; 2,79 e 2,68 g biossurfactante/g AR, respectivamente.

5.4.3 Produtividade

A máxima produtividade é definida como sendo a maior razão entre a concentração de biossurfactante produzido em determinado intervalo de tempo de cultivo (Δt).

A modificação das condições fisiológicas e composição do meio de cultivo são algumas alternativas que aumentam a produtividade. Diante deste fato observa-se na Tabela 6 os ensaios com suas respectivas produtividades, onde nota-se que as condições que influenciaram positivamente e tiveram alta produtividade foram os ensaios 7, 8 e 12.

Produtividade= concentração de biossurfactante/ tempo de processo

Tabela 6 - Produtividade em (g/L.h) de cada ensaio produzido.

Ensaio	Produtividade (g/Lh)
1	0,0075
2	0,0083
3	0,0097
4	0,0092
5	0,0108
6	0,0144
7	0,0246
8	0,0254
9	0,0088
10	0,0081
11	0,0193
12	0,0204
13	0,0123
14	0,0123
15	0,0123

5.5 Análise dos resultados das variáveis dependentes (biomassa e biossurfactante) em função do planejamento experimental proposto.

5.5.1 Biomassa

A matriz de ensaio com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas e as respostas obtidas para o aumento da biomassa estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7- Matriz do planejamento Box-Behnken com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de Biomassa (g/L).

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	Aumento de Biomassa (g/L)
1	-1 (5,0)	-1 (1,0)	0 (0,5)	1,09
2	+1 (7,0)	-1 (1,0)	0 (0,5)	1,21
3	-1 (5,0)	+1 (2,0)	0 (0,5)	1,31
4	+1 (7,0)	+1 (2,0)	0 (0,5)	1,12
5	-1 (5,0)	0 (1,5)	-1 (0,0)	1,21
6	+1 (7,0)	0 (1,5)	-1 (0,0)	1,29
7	-1 (5,0)	0 (1,5)	+1 (1,0)	2,19
8	+1 (7,0)	0 (1,5)	+1 (1,0)	2,11
9	0 (6,0)	-1 (1,0)	-1 (0,0)	1,37
10	0 (6,0)	+1 (2,0)	-1 (0,0)	1,08
11	0 (6,0)	-1 (1,0)	+1 (1,0)	2,26
12	0 (6,0)	+1 (2,0)	+1 (1,0)	1,71
13	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	1,41
14	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	1,41
15	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	1,36

^apH da reação

^bInóculo (% V/V)

^cSuplementação (% m/V)

Observa-se na Tabela 7 que a biomassa variou de 2,26 a 1,08 g/L (ensaios 11 e 10). Analisando os resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Coeficientes de regressão para a Biomassa (g/L).

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (2)	p – valor
Intercepto	1389,81	16,34	85,08	0,000138
x ₁ (L)	-7,14	10,00	-0,71	0,549281
x ₁ (Q)	-55,98	14,72	-3,80	0,062751
x ₂ (L)	-89,29	10,00	-8,93	0,012321
x ₂ (Q)	-148,83	14,72	-10,11	0,009646
x ₃ (L)	417,14	10,00	41,70	0,000575
x ₃ (Q)	364,02	14,72	24,72	0,001632
x ₁ .x ₂	-76,43	14,15	-5,40	0,032595
x ₁ .x ₃	-39,29	14,15	-2,78	0,108896
x ₂ .x ₃	-65,00	14,15	-4,59	0,044248

L- termos lineares; Q- termos quadráticos.
X₁: pH da reação
X₂: Inóculo (% V/V)
X₃: Suplementação (% m/V)

Pode-se verificar na Tabela 8 que, com exceção do pH, termo quadrático (x₁), e interação pH com suplementação (x₁ . x₃), as demais variáveis apresentaram efeitos estatisticamente significativos (p≤0,05) sobre a resposta de biomassa (g/L).

Nota-se que apenas a suplementação (X₃) apresentou efeito positivo sobre a concentração da biomassa, ou seja, maiores valores de biomassa foram observados quando a suplementação estava no nível superior (+1). Ao passar a concentração da suplementação de 1,0% para 2,0% a biomassa aumentou aproximadamente 834,3 g/L. Entretanto, os demais efeitos, como o pH (X₁) e porcentagem de inóculo(X₃), bem como as interações apresentam efeitos negativos sobre a concentração da biomassa, indicando que o maior crescimento celular ocorre a menores valores para estes componentes, dentro da faixa estudada.

Considerando-se os parâmetros significativos (p≤0,05) obteve-se a Equação 4, que representa o modelo quadrático da biomassa em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 9. O F_{calculado} da regressão apresentou-se significativo (0,001088), sendo maior que o F_{tabelado}, e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado (R² ≈ 87%), podendo assim, concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais.

$$Biomassa (g/L) = 1389,81 - 7,14 X_1 - 89,29X_2 + 417,14 X_3 - 148,83 X_2^2 + 364,02 X_3^2 - 76,43 X_{12} - 65,00X_{23} \quad (4)$$

Tabela 9 - ANOVA do modelo quadrático para predição da Biomassa (g/L).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	p-valor
Regressão	2109377,00	7	301339,57	14,62	3,79	0,001088
Resíduo	144250,00	7	20607,14			
Falta de ajuste	142649,00	5	28529,80	35,64	19,30	0,027516
Erro puro	1601,00	2	800,50			
Total	2253627,00	14	-			

R² ajustado: 87,20%

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios.
R² ajustado: Variação explicada ajustada

O Gráfico 2 apresenta a distribuição normal dos resíduos. Como se pode observar no gráfico, os pontos estão próximos à reta, indicando a normalidade dos dados.

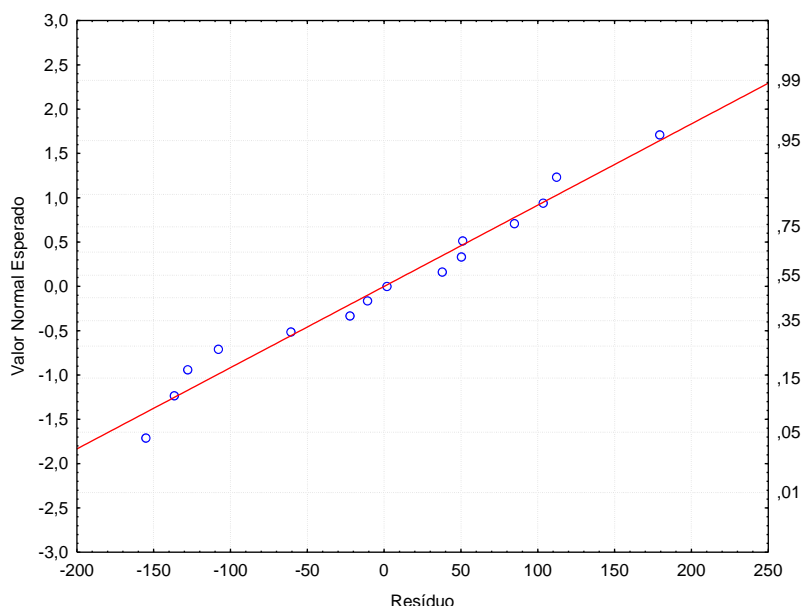


Gráfico 2 -Distribuição normal dos resíduos do planejamento Box-Behnken com três fatores de estudo para a resposta Biomassa (g/L).

A curva de contorno para biomassa em função da concentração de inóculo e da suplementação ancorada com pH 6 pode ser observada na Figura 4. Nota-se que a suplementação (X_3) apresenta maior influência sobre a produção da biomassa quando comparada com a concentração de inóculo e que valores máximos de biomassa foram obtidos utilizando 1,0% de suplementação e até 1,75 % de inóculo.

Em virtude dos resultados encontrados para a biomassa, pode-se dizer que o meio composto por melaço e suplementado com extrato de levedura e peptona foi capaz de promover o crescimento do microrganismo e assim aumentar a biomassa.

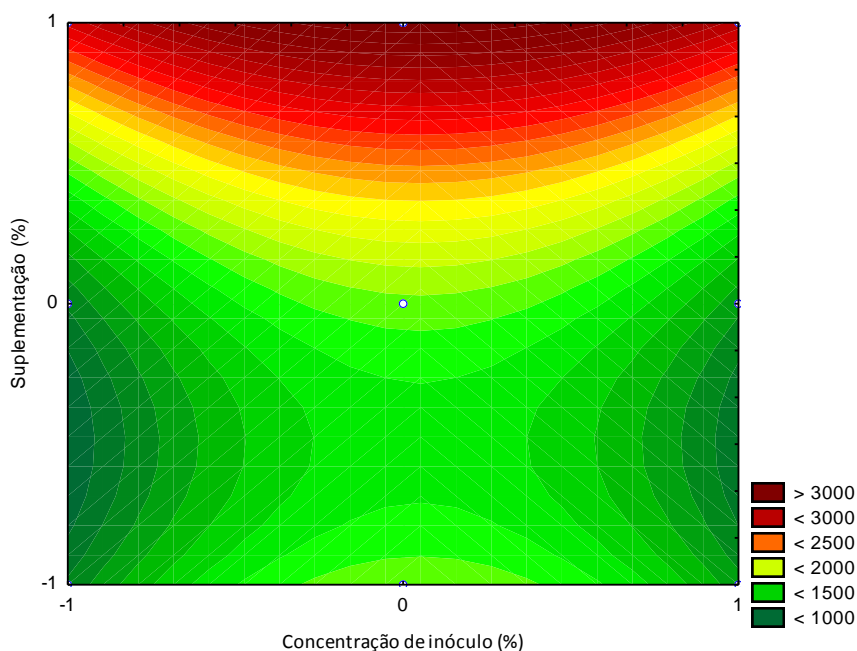


Figura 3 - Curva de contorno para a biomassa em função da concentração de inóculo e da suplementação, fixo em pH 6 (ponto central).

5.5.2 Biossurfactante (g/L)

A matriz de ensaio com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas e as respostas obtidas para o biossurfactante estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 - Matriz do planejamento Box-Behnken com níveis reais e codificados das variáveis, respostas de Biossurfactante (g/L).

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	Biossurfactante (g/L)
1	-1 (5,0)	-1 (1,0)	0 (0,5)	1,08
2	+1 (7,0)	-1 (1,0)	0 (0,5)	1,20
3	-1 (5,0)	+1 (2,0)	0 (0,5)	1,39
4	+1 (7,0)	+1 (2,0)	0 (0,5)	1,32
5	-1 (5,0)	0 (1,5)	-1 (0,0)	1,55
6	+1 (7,0)	0 (1,5)	-1 (0,0)	2,07
7	-1 (5,0)	0 (1,5)	+1 (1,0)	3,54
8	+1 (7,0)	0 (1,5)	+1 (1,0)	3,65
9	0 (6,0)	-1 (1,0)	-1 (0,0)	1,27
10	0 (6,0)	+1 (2,0)	-1 (0,0)	1,17
11	0 (6,0)	-1 (1,0)	+1 (1,0)	2,78
12	0 (6,0)	+1 (2,0)	+1 (1,0)	2,93
13	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	1,77
14	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	1,77
15	0 (6,0)	0 (1,5)	0 (0,5)	1,77

^apH da reação.

^bInóculo (% V/V).

^cSuplementação (% m/V).

Observa-se na Tabela 10 que a concentração de biossurfactante variou de 3,65 a 1,08 g/L (ensaios 8 e 1). Essa faixa de resultados referente ao biossurfactante obtido pode ser considerada adequada, visto que Penna et. al (2014), avaliou a produção de biossurfactantes a partir do cultivo de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e *Bacillus subtilis* W1012 (GFP uv) em meio TSB (Tryptone Soy Broth) e alcançou produção de 0,40 g/L e 0,50 g/L respectivamente. Pode-se perceber então que no presente trabalho o processo fermentativo proporcionou a obtenção de alta concentração de biossurfactante quando comparado ao trabalho de Penna et. al. para o mesmo microrganismo.

Analisando os resultados do planejamento foi possível determinar os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Coeficientes de regressão para a Biossurfactante (g/L).

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (2)	p – valor
Intercepto	1770,71	2,03	871,39	0,000001
x ₁ (L)	85,00	1,24	68,31	0,000214
x ₁ (Q)	71,25	1,83	38,90	0,000660
x ₂ (L)	60,54	1,24	48,65	0,000422
x ₂ (Q)	-592,68	1,83	-323,57	0,000010
x ₃ (L)	855,54	1,24	687,52	0,000002
x ₃ (Q)	860,89	1,83	470,00	0,000005
x ₁ .x ₂	-47,14	1,76	-26,79	0,001391
x ₁ .x ₃	-100,71	1,76	-57,23	0,000305
x ₂ .x ₃	61,79	1,76	35,11	0,000810

*p≤0,10; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.
X₁: pH da reação
X₂: Inóculo (% V/V)
X₃: Suplementação (% m/V)

Nota-se que a concentração de inóculo (X₂) e as interações de pH com inóculo (x₁ . x₂) e pH com suplementação (x₁ . x₃) apresentaram efeitos negativos sobre a concentração de biossurfactante, ou seja, maiores valores de biossurfactante foram observados quando a concentração estava no nível inferior (-1). Entretanto, o efeito da suplementação, pH e interação inóculo com suplementação (x₂ . x₃) foram positivos, afirmando que quando usados no nível superior aumentam a produção de biossurfactante. Observa-se que a adição de suplemento resultou em um aumento aproximado de 1711,08 g/L de biossurfactante. Sendo assim, a máxima produtividade de biossurfactante foi constatada com 1% (+1) de suplementação, pH ajustado para 7 (+1) e 1% (-1) de inóculo de *Bacillus subtilis*, dentro da faixa estudada.

Considerando os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) obteve-se a Equação 5, que representa o modelo quadrático de biossurfactante em função das variáveis estudadas. Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 12. O $F_{\text{calculado}}$ da regressão apresentou-se significativo (0,000075), sendo maior que o F_{tabelado} , e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 98\%$), podendo assim, concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais.

$$\text{Biossurfactante (mg/L)} = 1770,71 + 85,00X_1 + 60,54X_2 + 860,89X_3 + 71,25X_1^2 - 592,68X_2^2 + 860,89X_3^2 - 47,14X_{12} - 100,71X_{13} + 61,79X_{23} \quad (5)$$

Tabela 12 - ANOVA do modelo quadrático para predição da Biossurfactante (g/L).

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	10366575,00	9	1151841,67	78,83	4,77	0,000075
Resíduo	73060,00	5	14612,00			
Falta de ajuste	73035,00	3	24345,00	1947,60	19,16	0,000513
Erro puro	25,00	2	12,50			
Total	10439635,00	14	-			$R^2_{\text{ajustado}}: 98,04\%$

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios.
 R^2_{ajustado} : Variação explicada ajustada

Segundo Barros et al. (2010), pode-se considerar uma regressão útil para fins de previsão se o valor de $F_{\text{calculado}}$ for, pelo menos, cerca de dez vezes o valor do ponto da distribuição F com o número apropriado de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido. Ao analisar os valores de F na Tabela 12, nota-se que o F calculado é muito maior que o F tabelado, assim pode-se dizer que o modelo da regressão é confiável.

O Gráfico 3 exibe a distribuição normal dos resíduos. Como se pode analisar, os pontos estão próximos à reta, indicando a normalidade dos dados.

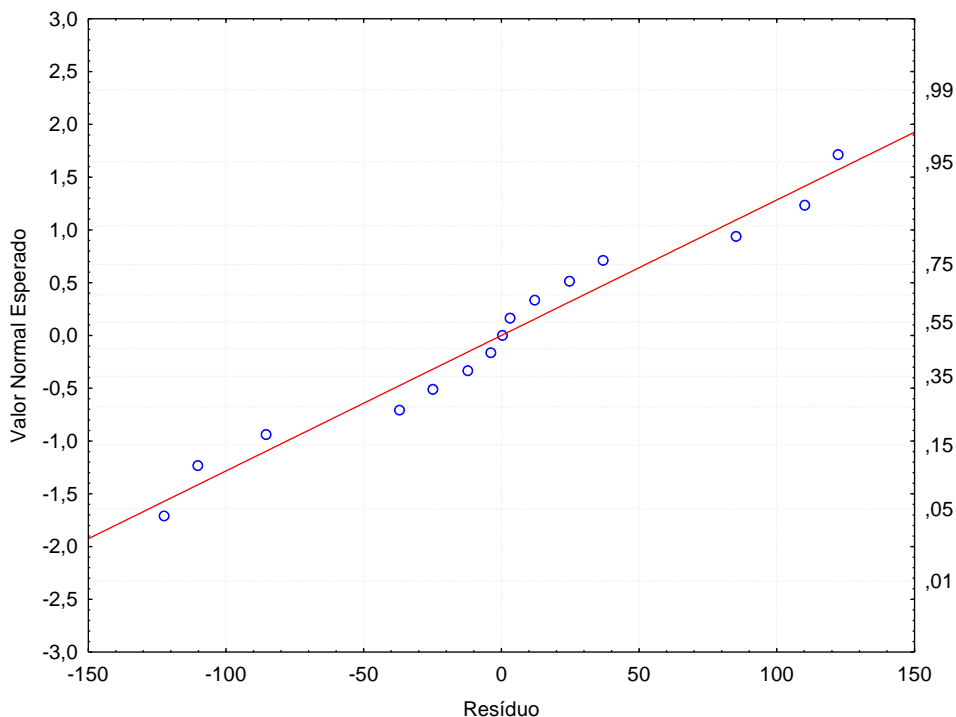


Gráfico 3 - Distribuição normal dos resíduos do planejamento Box-Behnken com três fatores de estudo para a resposta Biossurfactante (g/L).

Na Figura 4 observa-se a curva de contorno para biossurfactante em função do pH e concentração de inóculo, que foi construída com a suplementação no ponto central. Nota-se que, na faixa estudada, a maior produção de biossurfactante está quando a concentração de inóculo está no ponto central e pH no nível superior.

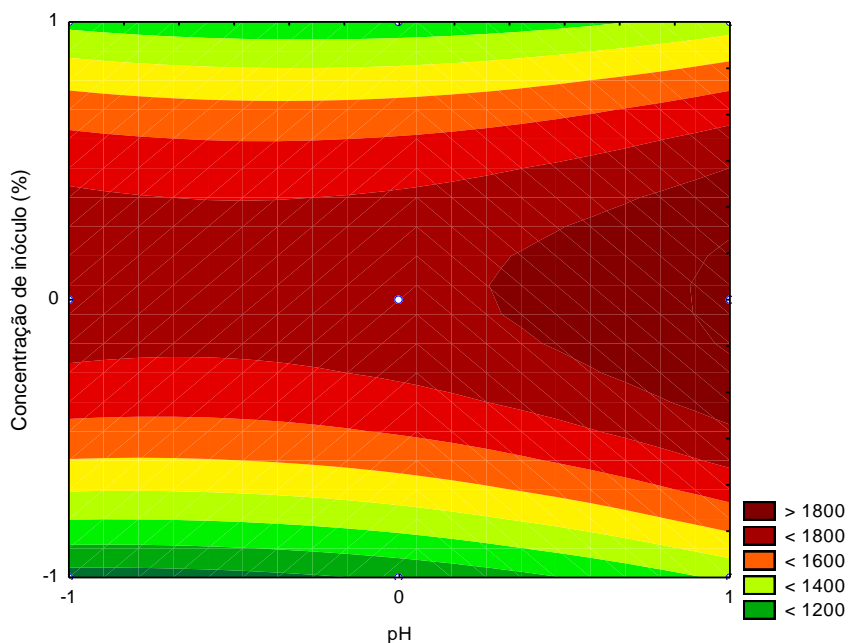


Figura 4 - Curva de contorno para o biossurfactante em função da concentração de inóculo e do pH, com suplementação fixa no ponto central (0,5%).

A curva de contorno para biossurfactante em função da suplementação e pH, construída com a concentração de inóculo no ponto central pode ser notada na Figura 6. Os maiores valores estão na faixa superior de suplementação e pH pode ser inferior ou superior, dentro da faixa estudada, resultando em alta produtividade.

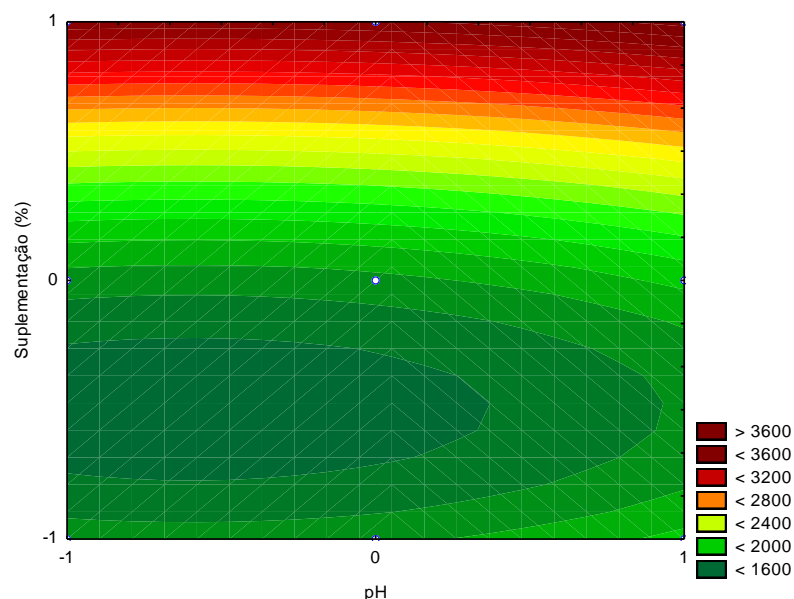


Figura 5 - Curva de contorno para o biossurfactante em função da suplementação e do pH, com concentração de inóculo fixa no ponto central.

A Figura 7 apresenta a curva de contorno para o biossurfactante em função da concentração de inóculo e da suplementação ancorada em pH no ponto central. Nota-se que o nível superior da suplementação proporcionou maior produção de biossurfactante e que não há muita diferença ao mudar a quantidade de inóculo, pois são próximas a quantidade estimada de biossurfactante nos níveis estudados.

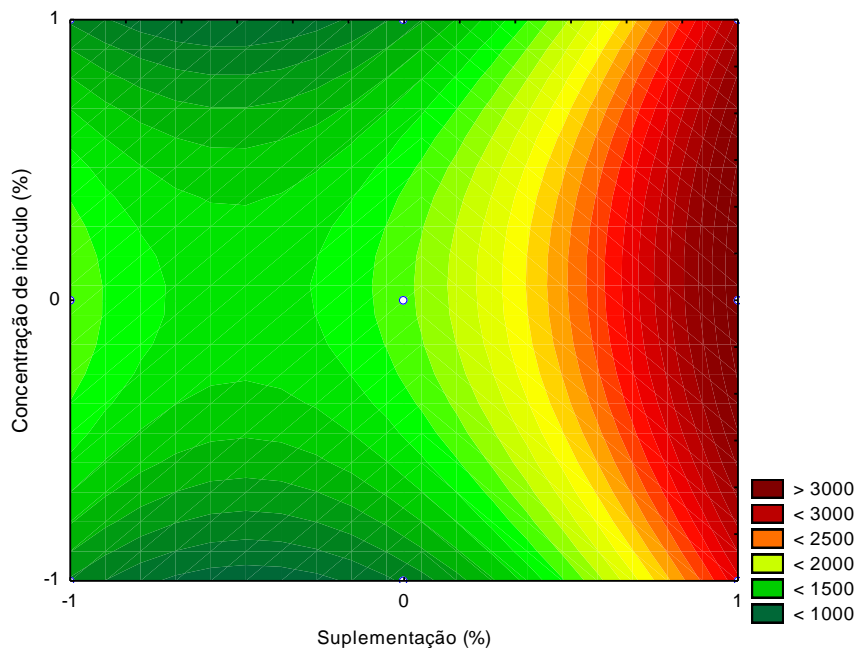


Figura 6 - Curva de contorno para o biosurfactante em função da concentração de inóculo e da suplementação ancorada em pH do ponto central.

Torna-se interessante ressaltar que, as melhores condições para o desenvolvimento do microrganismo e produção de biosurfactane, foram as que tiveram a adição de suplementação e ficaram na faixa do pH neutro ou pH 7.

5.6 Determinação da Atividade Emulsificante

A emulsificação é uma propriedade que alguns compostos anfifílicos apresentam ao promover a dispersão de um líquido em outro, através da formação de gotículas ou emulsões. Um importante parâmetro de avaliação do poder de emulsificação é o Índice de Emulsificação (IE) e da estabilidade da emulsão (COSTA, 2005; NITSCHKE e PASTORE, 2006). Segundo estudos, as bactérias com atividade biosurfactante produzem emulsões estáveis após 24 horas, pelo fato de produzirem substâncias anfifílicas como os biosurfactantes (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA; 2000).

A Tabela 13 apresenta os resultados referentes à análise de Atividade Emulsificante de uma solução do biosurfactante produzido frente a 3 substâncias óleo de soja; querosene e heptano.

Tabela 13 - Atividade Emulsificante (%) de emulsão formada em óleo, querosene e heptano.

Ensaio	(%) óleo	(%) querosene	(%) heptano
1	58	*	*
2	58	*	*
3	58	1,67	*
4	58	1,67	3,34
5	58	5	8,34
6	58	1,67	*
7	58	*	*
8	58	1,67	1,67
9	58	8,34	8,34
10	58	1,67	1,67
11	58	3,34	5
12	58	*	*
13	58	1,67	1,67
14	58	1,67	1,67
15	58	1,67	1,67

(*): Não formou

Diante dos resultados observados, nota-se que no heptano e querosene o biossurfactante não foi capaz de interagir com as moléculas e formar uma camada de emulsão maior que 8%; já com óleo de soja pode-se observar que para todos os experimentos o biossurfactante conseguiu formar uma camada de emulsão de quase 60%.

Analisando as três substâncias avaliadas pode-se dizer que o heptano é o mais apolar, seguido do querosene e por fim o óleo de soja que dentre os três é o menos apolar. Essa análise permite sugerir que o biossurfactante obtido é capaz de formar melhores emulsões com substâncias menos apolares. Porém, há necessidade de realizar mais experimentos em relação à possibilidade de formação de emulsão entre o biossurfactante obtido e substâncias de diferentes polaridades.

As Figuras 7, 8 e 9; apresentam alguns resultados obtidos para a Atividade emulsificante.

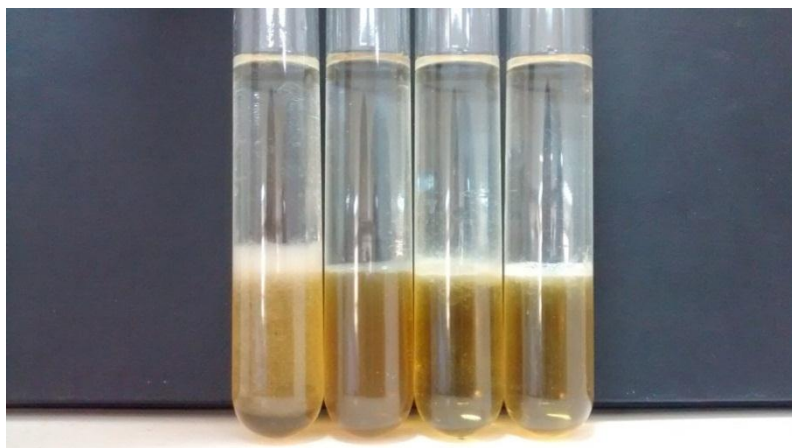


Figura 7 - Atividade Emulsificante com óleo(9-6-5-3).

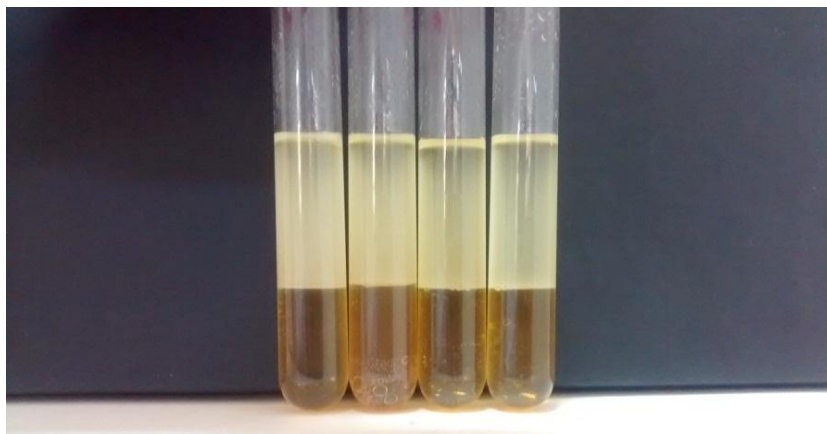


Figura 8 - Atividade emulsificante com querosene (9-6-5-3).

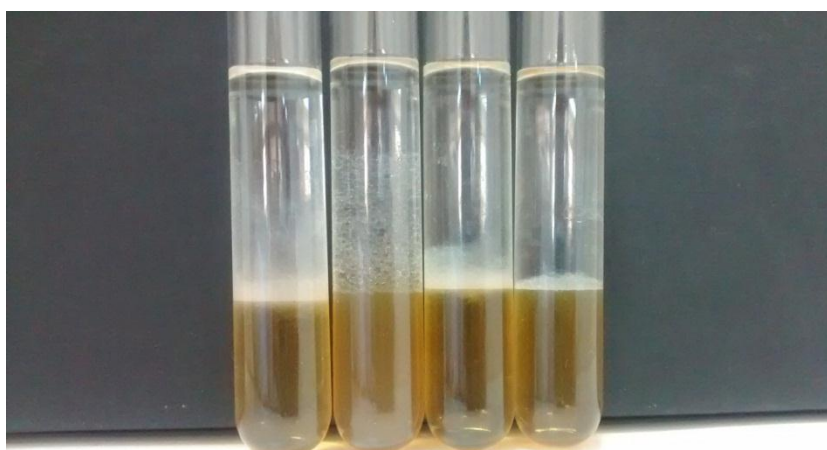
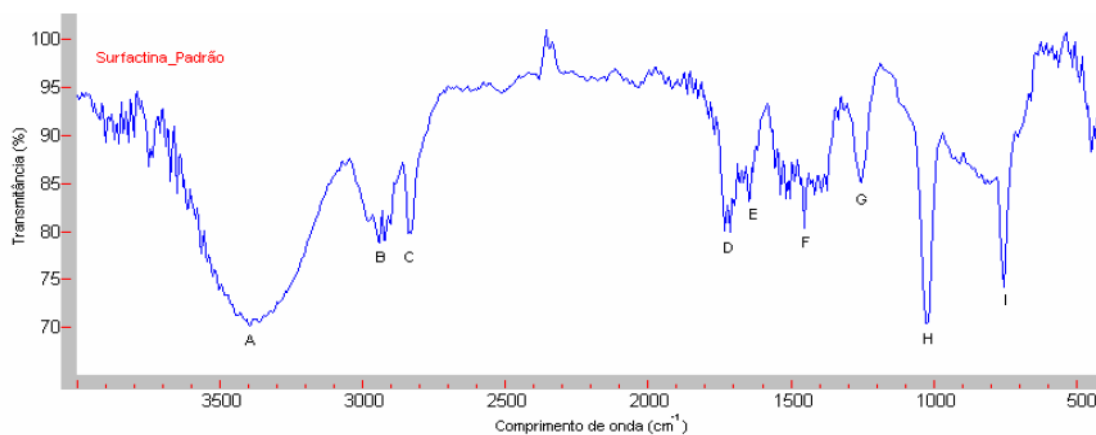


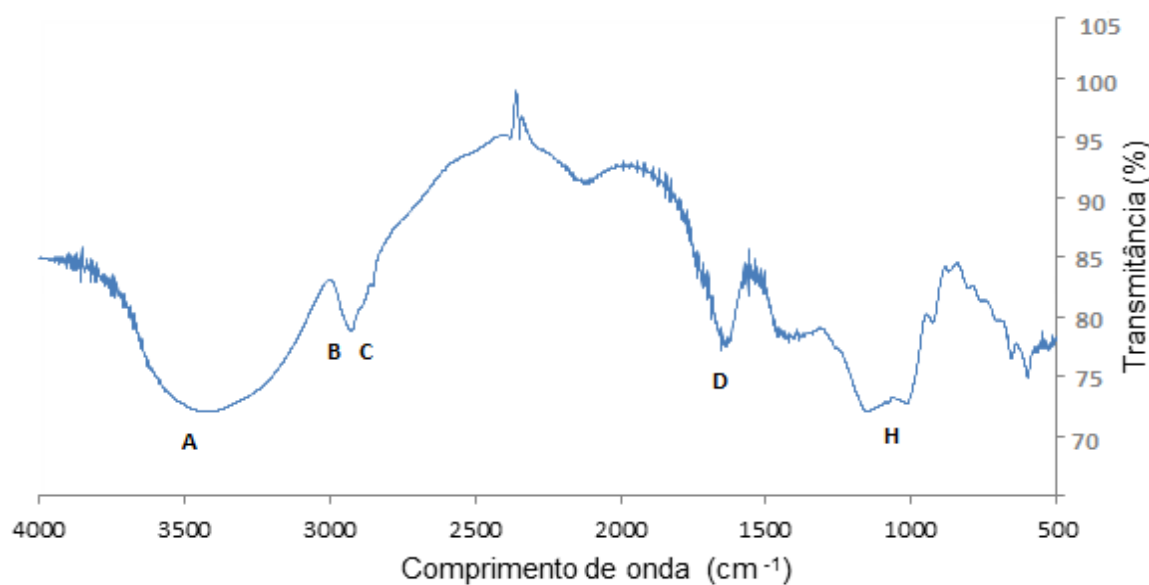
Figura 9 - Atividade Emulsificante com heptano (9-6-5-3).

5.7 Análise de Infravermelho

Com o objetivo de tentar verificar o biossurfactante produzido, foi realizada análise de Infravermelho e o resultado apresentado na Figura 11 (a) e (b). A Figura 11 (a) apresenta o espectro infravermelho de uma amostra de surfactina comercial denominada como padrão; e a Figura 11 (b) apresenta o espectro infravermelho do biossurfactante obtido neste trabalho.



(a)



(b)

Figura 11 - Espectro infravermelho (a) amostra comercial de surfactina produzido por *B.subtilis*. Fonte: Rocha (2007); e (b) biossurfactante produzido neste trabalho.

Da Figura 11 (a) e de acordo com Rocha (2007) observa-se bandas características de peptídeos a 3298 cm^{-1} (A) resultante do estiramento da ligação O-H e N-H. (B) e (C) representam as bandas de absorção nas frequências de 2800 a 2950 cm^{-1} que se deve a deformação axial de C-H; $\nu_{\text{as}}\text{ CH}_3$, $\nu_{\text{as}}\text{ CH}_2$. A banda em 1734 cm^{-1} (D) refere-se à absorção de grupo carbonil de anel lactona. Em 1652 cm^{-1} (E) verifica-se o estiramento da ligação C=O e as bandas (F) e (G) representam a deformação angular (δ) no plano das ligações de C-H, enquanto que as bandas (H) e (I) apresentam a deformação angular (δ) simétrica fora do plano das ligações C-H.

Ao comparar a Figura 11 (a) com a 11 (b), nota-se que a presença da cadeia alifática e porção peptídica. A banda A mostra-se semelhante do padrão da

surfactina com a amostra, demonstrando presença dos peptídeos. A banda em 1734 cm^{-1} (D) que refere-se à absorção de grupo carbonil de anel lactona também pode ser representada na amostra da Figura 11 (b).

Estes resultados indicam a formação de um possível biossurfactante, porém para afirmar a veracidade seria necessário outras análises para confirmar a formação da surfactina.

6. CONCLUSÃO

Pode-se notar que os resultados promissores obtidos nesse trabalho indicam a viabilidade de produção de biossurfactante a partir de resíduos agroindustriais, como o melaço de cana de açúcar. Acredita-se que, através da otimização dos parâmetros do processo produtivo, é possível aumentar a produção de biossurfactantes do sistema com os fatores que tiveram mais significância. Neste estudo, os resultados dentro da faixa estudada mostraram que o pH e a porcentagem de inóculo inicial não interferiram significativamente na produção da biomassa, porém a suplementação favoreceu o crescimento do microrganismo. Pode-se observar também que os três fatores estudados influenciaram na produção do biossurfactante sendo que a suplementação interferiu de forma positiva, assim como para a biomassa. Através do índice de emulsificação pôde-se observar a formação de camada emulsificada na interface biossurfactante com o óleo de soja, indicando a capacidade emulsificante do biossurfactante obtido. A análise de Infravermelho indicaram possíveis bandas características da surfactina, porém para afirmar a veracidade seria necessário outras análises.

7. SUGESTÕES

Este foi um trabalho pioneiro de exploração da possibilidade de produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 9372 que utilizou o melaço de cana de açúcar como substrato e o auxílio do planejamento experimental para identificar parâmetros significativos no processo. Devido a extensa particularidade dos biossurfactantes, recomenda-se a continuação do estudo, sugerindo-se, particularmente:

- Otimizar a produção de biossurfactante, uma vez que os rendimentos ainda foram baixos se comparados com os descritos na literatura;
- Estudar a utilização de novos substratos que possibilitem o desenvolvimento do processo;
- Otimizar o processo de extração e de purificação do biossurfactante;
- Desenvolver estudos de aplicação do biossurfactante.
- Aprofundar a caracterização do biossurfactante, com respeito às suas propriedades físico-químicas (índice de emulsificação frente a diferentes compostos e determinação de tensão interfacial).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BARROS, F.F. C.; MANO, M. C. R.; BICAS, J. L.; DIONISIO, A.; QUADROS, C. P.; UENOJO, M.; NERI, I. A. & PASTORE, G.M. Production and Stability of *Bacillus subtilis* Biosurfactants Using Cassava Wastewater in a Pilot Scale. **Journal of Biotechnonology**, v. 131, p. 172-173, 2007.
- BARROS, B. N; SCARMINIO, I. S; BRUNS, R. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4.ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2010. 413 p.
- BEZERRA, M. S., **Levantamento e Avaliação de Critérios para a Ampliação de Escala da Produção de Biosurfactante utilizando melão como substrato. 2006. 101f.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal/RN. 2006.
- BUENO, S. M.; SILVA, A. N; CRUZ, C.H.G. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.
- CARA, D. V. C. **Produção de biosurfatante por *flavobacterium sp.* a partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial.** 2009. 71 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2009.
- CIAPINA, E. M. P. **Produção de Biosurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em Biorreator de Bancada e Avaliação do seu Efeito na Biodegradação de Borra Oleosa da Indústria do Petróleo.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Instituto de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro, 2008.
- CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Avaliação da permeabilização de células de *Candida guilliermondii* empregando tensoativo catiônico CTAB. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 17, 2008, Recife. **Anais...** Recife: UFPE, 2008.
- COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.** 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005,
- FONSECA, R. R.et al. Optimizing Carbon/ Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a *Bacillus subtilis* Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Rio de Janeiro, v. 136- 140, p. 471- 486, 2007.

GOMES, M. J. P. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária**, Faculdade de Veterinária - FAVET-UFRGS, 2013.

HAULY, M. C. O; OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. S. **Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 24, n.1, p. 133- 142, jan./jun.2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3 ed. São Paulo: IMESP, p. 157, 1985.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal Biosciencia end bio Engineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p.101-116, 2003.

MALDONDE, I. R.; CARVALHO, P. G.B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Comunicado Técnico. 2013. Ministério da Agricultura e abastecimento. Embrapa 2013.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactantes: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, 2008.

NEVES, L. C. M. et al. Biosurfactant Production by Cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in Semidefined Glucose/Casein-Based Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 539-553, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, p. 63-67, jul/dez. 2003.

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

NITSCHKE, M. E PASTORE, G. M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 12, p.163- 72, 2004.

OKURA, M. H. & RENDE, J. C. **Microbiologia – roteiros de aulas práticas**. São Paulo: Tecmedd, 2008.

PARREIRA, A. G. **Produção de Biossurfactantes e Recuperação de óleo pesado em meios porosos não-consolidados**. 2009. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

PACHECO, G. J. **Produção de Biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua Aplicação na Remoção de Óleo de Sedimentos Arenosos**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PENNA, T. C. V. et al. **Avaliação da Produção de biossurfactantes a partir do cultivo de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e *Bacillus subtilis* W1012 (GFP uv) em meio TSB (TryptoneSoyaBroth)**. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

PIROG, T. P.; SHEVCHUK, T.A.; VOLOSHINA, I. N. AND KARPENKO, E. V. Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, p. 544-550, 2004.

REIS, F.; SÉRVULO, E.; DE FRANÇA, F. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.115, 899-912, 2004.

ROCHA, M. V. P. **Produção de Biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 146 p. 2007

SOBRINHO, H. B. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*** 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenoides por *Sporodiobolus salmonicolor* CBS 2636**. 2005. 189 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

VALPUESTA, R. R. F. **Otimização da Produção de Biossurfactantes por Isolado de *Bacillus subtilis* a partir de matéria prima renovável**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 95p. 2008.

WEI, Y-H.; WANG, L-F.; CHANGY, J-S.; KUNG, S-S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal Bioscience Bioeng**, v. 96, p. 74-178, 2003.

ZANA, R. **Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, micro emulsions, vesicles, and lyotropic phases**. (Surfactant science series; v. 125) New York: CRC Press, 2005. 539. Disponível em: < <http://migre.me/kmlz6> > Acesso em: 22 mai.2014

ANEXO I

Para ativar o microrganismo que se encontrava na forma de esporos secos e obter o inóculo procedeu-se da seguinte forma: preparou-se um meio de cultura (caldo) TSB (Tryptone Soya Broth 1% Ágar) e este foi esterilizado em autoclave (Pimatec[®]) a 121°C e 1 atm por 15 minutos (condição padrão de esterilização); em câmara de fluxo laminar (Bio Seg 09[®]) estéril inoculou-se a fita com os esporos dentro do tubo de ensaio com 10 mL do meio preparado; então o sistema foi incubado em Estufa bacteriológica (Quimis[®]) à 35°C por 48 horas; após este período a solução foi transferida (em fluxo laminar estéril) para um erlenmeyer contendo 100 mL do mesmo meio e novamente incubado à 35°C por 48 horas.

Para a manutenção do microrganismo empregou-se o seguinte procedimento: foram preparados slants (tubos com Ágar inclinado) utilizando TSB como meio de cultura, estes foram esterilizados e então colocados sobre a bancada para que o meio se solidificasse inclinado; então em câmara de fluxo laminar estéril fez-se a inoculação do microrganismo ativado, conforme apresentado anteriormente, na superfície dos slants com uma alça e inoculação; os tubos foram incubados em estufa bacteriana a cerca de 35°C por 48 horas e após foram acondicionados à 5°C em geladeira para uso subsequente.

Na caracterização e padronização do inóculo foi utilizada a técnica da diluição seriada do número de células viáveis, por semeadura (0,1 mL) em profundidade em placas com ágar TSB incubadas a 35°C por 24 horas. Para tanto, empregou-se o seguinte protocolo de acordo com Okura (2008): Agitou-se a cultura da bactéria e transferiu assepticamente 1,0 mL para 9,0 mL de água peptonada 0,1% estéril, obtendo a diluição 10^{-1} . As outras diluições foram obtidas de maneira similar até diluição de 10^{-9} ; foram transferidos 1 mL de cada diluição selecionada (10^{-1} a 10^{-9}) para placas de Petri estéreis e identificadas; em seguida, verteu-se 15 mL a 20 mL de ágar fundido em cada uma delas; as placas foram submetidas a suaves movimentos rotatórios (em forma de oito), visando à perfeita mistura de cultura com o ágar; esperou-se a completa solidificação, inverteu-se as placas e incubou a 35°C por 24 horas; transcorrido o tempo de incubação, fez-se a contagem do número de colônias, com auxílio de um contador de colônias (Phoenix CP 600) das duplicatas que apresentaram número de 30 e 300 Unidades Formadora de Colônias (UFC).

Então multiplicou-se a média aritmética das duplicatas pelo respectivo fator de diluição, assim, os resultados puderam ser expressos em UFC/ mL.