

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

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

**OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE OBTIDO POR *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 9372**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2015

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

**OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE OBTIDO POR *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 9372**

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 Engenheiro de Alimentos.

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

CAMPO MOURÃO

2015



TERMO DE APROVAÇÃO

**OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE OBTIDO POR *BACILLUS SUBTILIS* ATCC
9372**

POR

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado em 26 de novembro de 2015 às 15:30 horas como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. O candidato foi arguido 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

Prof. Dr. Augusto Tanamati
Membro da banca

Prof^a. Dr^a. Stéphanie Benetti
Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus, por ter me guiado e iluminado durante todos os dias de minha vida e principalmente por ter me dado paciência e sabedoria para encarar os vários desafios para enfim alcançar mais esse objetivo.

Seguidamente agradeço a meus pais pelo apoio prestado incansavelmente, me dando ânimo e força, me direcionando e induzindo ao caminho certo, confiando e me apoiando nas decisões a serem tomadas.

Agradeço também à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Mirela Vanin dos Santos Lima por confiar no meu trabalho e me dar total apoio diante de dúvidas e questionamentos, se dispondo em auxiliar sempre que necessário.

Aos meus companheiros que tive aqui na faculdade, Carlos, Heliberto, Thaysa, Marina, Andressa, Beatriz, Sara, Renan, Silvio, Valriane, Kézia, Jonar, Grenda, Fernanda, Daiane, Carina, Drielli, Bruno, Thais e Bruna pela parceria, amizade, troca de conhecimentos, aprendizado e principalmente os risos e brincadeiras.

Ao Fábio Nakamura, que esteve sempre a me auxiliar no que fosse preciso, sendo incansável e dedicado em tudo.

As empresas Clean-Up Brazil e Usaçúcar – Usina Santa Teresinha pelos materiais cedidos utilizados nesse trabalho.

Às empresas Edna Pães e Frigorífico Cristal pela oportunidade de aplicar os conhecimentos obtidos no setor industrial durante o período de estágio.

Aos amigos de tempos que vem sendo mantidos, Alexandre, Francielli, Marcelo, Lidian, Matheus, Dudu, Muller, Katiely, Ana, Gabriela, Vanessa, Nicole, Maria, Daniel, Isadora e Luana, que sempre estão do lado me fazendo rir e aprender com a vida.

Aos técnicos, estagiários, supervisores, porteiros, zeladores e jardineiros pelos serviços prestados e diálogo com os estudantes, se tornando acessíveis e prestativos diante de qualquer coisa.

Por fim, agradeço imensamente a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, com sabedoria e principalmente pela exigência necessária para formar verdadeiros profissionais, e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná por ser acessível aos acadêmicos e pela qualidade de ensino e conforto prestado no decorrer da faculdade.

RESUMO

MAROLDI, Wédisley Volpato. **Obtenção, purificação e caracterização de biosurfactante obtido por *Bacillus subtilis* ATCC 9372**. 2015. 58 f. (Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em Engenharia de Alimentos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

Surfactantes são substâncias que apresentam caráter anfifílico por possuir na estrutura molecular porções lipofílicas e hidrofílicas, assim, possuem a capacidade de se incorporarem na interface de uma mistura insolúveis reduzindo a tensão superficial entre elas e, promovendo a formação de uma emulsão. Contudo em função da grande utilização dos surfactantes observa-se a necessidade de desenvolver novas formas de produção, bem como, o uso de fontes naturais e renováveis, que caracterizam a obtenção dos biosurfactantes. Os biosurfactantes podem ser obtidos através de uma rota metabólica de microrganismos específicos. O uso destes tem sido ampliado, porém o custo produtivo dos biosurfactantes ainda é alto quando comparado aos surfactantes. Assim, o presente trabalho teve por objetivo a obtenção, purificação e caracterização de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. Deste modo o substrato, solução aquosa de melaço, foi hidrolisado enzimaticamente e clarificado, teve seu pH ajustado para 6,8, e realizou-se uma suplementação deste; então o meio foi esterilizado e posteriormente inoculado com o *Bacillus subtilis*. O processo fermentativo ocorreu em batelada em um biorreator de bancada de 7L sob agitação de 160 rpm, à 36°C durante 144 horas. Para acompanhar o processo fermentativo foram realizadas análises de açúcar redutor (AR), pH, temperatura, biomassa e quantidade de biosurfactante, para tanto, o biosurfactante foi recuperado e purificado do meio fermentativo utilizando a técnica de borbulhamento, seguida de centrifugação, precipitação com solvente e seco em estufa até peso constante. Ao final do processo o biosurfactante obtido foi caracterizado através do FTIR, e atividade emulsificante. Os resultados demonstraram que os parâmetros de processo utilizados, bem como, o melaço como meio de cultura foi capaz de proporcionar uma fermentação típica, com possível viabilidade técnica. O produto formado com a purificação metanólica apresentou maior poder emulsificante. O FTIR demonstrou apenas evidências dos grupamentos da surfactina, necessitando de mais análises para afirmar o composto formado.

Palavras-chave: Biosurfactante. Borbulhamento. *Bacillus subtilis*. Purificação etanólica. Atividade Emulsificante.

ABSTRACT

MAROLDI, Wédisley Volpato. Obtainment, Purification and characterization of the biosurfactant obtained from *Bacillus subtilis* ATCC 9372. 2015. 58f. (Working graduation of Course in Food Engineering) Technological University Federal of Parana. Campo Mourão, 2015.

Surfactants are substances that have amphiphilic character in molecular structure to possess lipophilic and hydrophilic portions thus have the ability to incorporate at the interface of an insoluble mixture reduces the surface tension between them, and promoting the formation of an emulsion. However due to the extensive use of surfactants there has been a need to develop new production methods and the use of natural and renewable sources, featuring obtaining the biosurfactants. The biosurfactants may be obtained through a specific metabolic pathway of microorganisms. The use of these has been expanded, but the production cost of biosurfactants is still high when compared to surfactants. The present study aimed at obtaining, purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis*. Thus the substrate, aqueous molasses, was hydrolyzed enzymatically and clarified, its pH was adjusted to 6.8 and held supplementation thereof; and then the medium was sterilized and then inoculated with *Bacillus subtilis*. The fermentation took place in a batch bioreactor 7L bench under agitation of 160 rpm at 36°C for 144 hours. To monitor the fermentation process were performed reducing sugar analysis (AR), pH, temperature, biomass and amount of biosurfactant, therefore, the biosurfactant was recovered and purified from the fermentation medium using the bubbling technique, followed by centrifugation, precipitation with solvent and dried in stove until constant weight. At the end of the process the biosurfactant obtained was characterized by FTIR, and emulsifying activity. The results demonstrate that the process parameters used, as well as molasses as culture medium was capable of providing a typical fermentation, with a possible technical feasibility. The product formed with the methanol purification showed higher emulsifying power. The FTIR showed only evidence of groups of surfactin, requiring further analysis to affirm the finished compost.

Keywords: Biosurfactant. Bubbling. *Bacillus subtilis*. Purification ethanol. Emulsifier activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biosurfactantes listados na literatura junto a seus agentes produtores. ...	16
Tabela 2 - Tipo de reação, reagentes e produtos formados pelo gênero Bacillus. ...	18
Tabela 3 - Resultados das análises de pH, concentração de biomassa, AR e produto (biosurfactante) durante o processo fermentativo.	34
Tabela 4 - Resultados da concentração de biosurfactante, biomassa e açúcares redutores com a variação da metodologia aplicada.	37
Tabela 5 - Fatores de conversão e produtividade calculados.	38
Tabela 6 - Grupamentos base para a identificação da surfactina através da análise de espectro obtido por FTIR, segundo SOARES (2014).	39
Tabela 7 - Análise da fase óleo, emulsionada e água, seguindo a identificação descrita no item 5.5 transformada em percentagem de volume total para uma melhor análise.	43
Tabela 8 - Análise microscópica sob lente 10X das fases dos tubos E1, E2, E3 e E4 (descritos anteriormente) no dia 1.	45
Tabela 9 - Análise microscópica sob lente 10X das fases dos tubos E1, E2, E3 e E4 (descritos anteriormente) no dia 2.	46
Tabela 10 - Análise microscópica sob lente 10X das fases dos tubos E1, E2, E3 e E4 (descritos anteriormente) no dia 3.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo de um surfactante.	14
Figura 2 - Estrutura da principal isoforma da surfactina (BARROS et al., 2007)	19
Figura 3 - Esquema ilustrativo com as etapas do pré-tratamento do melãoço.	22
Figura 4 - Esquema ilustrativo do procedimento de ativação e preparação do inóculo do microrganismo.	23
Figura 5 - Imagem ilustrativa do biorreator TEC-BIO 7 litros vidro-inox.	24
Figura 6 - Pré-tratamento do melãoço diluído (Sendo da esquerda para a direita: Diluição do melãoço a 100 g/L; Ajuste térmico à 55°C; Ajuste do pH para 4,55; 5 minutos de reação enzimática; 10 minutos de reação enzimática; 20 minutos de reação enzimática).	30
Figura 7 - Pré-tratamento do melãoço diluído (Sendo da esquerda para a direita: 30 minutos de reação enzimática; 40 minutos de reação enzimática; 60 minutos de reação enzimática; 80 minutos de reação enzimática; após tratamento com carvão ativado 80 gramas por litro de solução submetido à 90°C por 1 hora; após ultrafiltração em temperatura ambiente; após esterilização a 121°C por 15 minutos).	31
Figura 8 - Concentração de AR (g/L) no período de pré-tratamento do caldo.	31
Figura 9 – Imagem de <i>Bacillus subtilis</i> coloridos pela técnica de Gram observados em microscópio óptico com aumento de 100X.	33
Figura 10 – Resultado da análise de pH (eixo y) durante o processo fermentativo (em horas).	34
Figura 11 - Resultado da concentração de biomassa seca, AR e produto formado em (g/L) no decorrer do processo fermentativo.	35
Figura 12 – À esquerda: amostra retirada antes do bioprocesso límpido e com coloração escura. A direita: Biorreator com substrato turvo e de coloração diferente, comparada à inicial.	36

Figura 13 - Espectrogramas vibracionais obtidos por FTIR Sigma Padrão e o obtido por SOARES (2014) dialisada e liofilizada, excretada por <i>B. subtilis</i> , cultivada em meio mineral, a 30°C, 150 rpm, 48 horas.....	40
Figura 14 - Espectro obtido pelo FTIR com curvas sobrepostas referente aos tratamentos descritos.	40
Figura 15 - Tubos contendo as emulsões formadas com os produtos após a emulsificação (tempo zero), da esquerda para a direita: E1, E2, E3 e E4.	42
Figura 16 - Tubos contendo as emulsões formadas com os produtos após 3 dias, sendo da esquerda para a direita: E1, E2, E3 e E4.	42
Figura 17 - Análise comparativa quanto ao volume da fase óleo (mL) ao longo do tempo (em dia).	43
Figura 18 - Análise comparativa quanto ao volume da fase emulsionada (mL) ao longo do tempo (em dia).	43
Figura 19 - Análise comparativa quanto ao volume da fase água (mL) ao longo do tempo (em dia).	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. Surfactantes	14
3.2. Biosurfactantes.....	15
3.3. Aplicação dos biosurfactantes	17
3.4. Produção de biosurfactantes pelo gênero <i>Bacillus</i>	17
3.5. A Sufactina	18
3.6. Alternativas para o substrato	20
4. METODOLOGIA	21
4.1. Preparo do Meio de Cultura.....	21
4.2. Aquisição, ativação do microrganismo e preparo do inóculo.....	22
4.3. Produção do Biosurfactante.....	23
4.4. Processo de Purificação do Biosurfactante.....	25
4.5. Determinações analíticas.....	26
4.6. Cálculo dos fatores de conversão e produtividade.....	27
4.6.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto (g/g).....	27
4.6.2. Fator de conversão de células em produto (g/g)	28
4.6.3. Produtividade.....	28
4.7. Caracterização do Biosurfactante	28
4.7.1. FT IR.....	28
4.7.2. Aplicação: atividade emulsificante e estabilidade da emulsão	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Resultado da construção da curva de calibração para a determinação de AR.....	30

5.2. Resultado do preparo e caracterização do substrato	30
5.3. Resultado do preparo e caracterização do inóculo	32
5.4. Resultados das determinações analíticas durante o bioprocessamento	33
5.5. Resultados das análises dos diferentes métodos de recuperação e purificação utilizados.....	36
5.6. Cálculo dos fatores de conversão e produtividade.....	38
5.7. Análise da espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR).....	39
5.8. Aplicação e análise comparativa do produto produzido com um produto sintético.....	41
6. CONCLUSÃO	49
7. SUGESTÕES.....	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXO 1: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE AR.....	57

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são agentes adsorventes que reduzem a tensão superficial ou interfacial entre duas fases com composições distintas. Tais agentes se incorporam na interface de uma mistura, contendo substâncias lipofílicas e hidrofílicas, e por possuir tal caráter anfifílico, o composto resultante tende a formar micelas, de modo a reduzir a atividade repulsiva com o dissolvente. Estes compostos podem ser de dois tipos, polímeros e substâncias similares ao sabão, ou seja, moléculas pequenas e anfifílicas cuja parte hidrofóbica é constituída basicamente por uma cadeia alifática, e a parte hidrofílica que pode ser constituída por uma grande variedade de compostos. Fatores como temperatura e quantidade de surfactante interferem diretamente na atividade superficial do composto formado. Devido a estas características o surfactante é altamente conhecido por seu potencial emulsificante. Tais compostos anfifílicos reduzem as tensões superficiais e interfaciais, fazendo com que haja acúmulo interfacial em fluídos imiscíveis acrescentando a eles uma maior solubilidade, mobilidade, biodisponibilidade e, conseqüentemente uma degradação da parte hidrofóbica ou insolúvel de compostos orgânicos (DAMODARAN, PARKIN & FENNEMA, 2010).

Desde 1921 os surfactantes são utilizados em indústrias alimentícias, contudo seu uso foi amplificado após a melhoria na produção destes, obtendo uma melhor qualidade com uma redução de interferentes. A partir daí foi amplamente utilizado em indústrias de panificação, onde proporcionavam ao pão um interior macio, depois em indústrias produtoras de margarina, como agente emulsificante, e também utilizado no tratamento de águas e efluentes, como agente de separação de fases, dentre várias outras descobertas (KROG, 1980).

Os surfactantes em uso são obtidos pelos derivados de petróleo, contudo o interesse por biosurfactantes de origem microbiológica estão crescendo, devido a suas características exclusivas, como a biodegradabilidade e baixa toxicidade (FONSECA et al., 2007). Tais compostos são formados através de uma rota biotecnológica, que conta com a ação de microrganismos sobre uma fonte de carbono e nitrogênio, podendo ser proveniente de resíduo ou subproduto industrial, variando

de acordo com as características de cada microrganismo, permitindo a obtenção de diversos produtos de características distintas (BANAT, 2000).

Os biosurfactantes também possuem como características positivas maior tolerância às condições diversas de pH, força iônica e temperatura, o que aumenta seu campo de aplicações, contudo o custo de produção ainda é elevado, deste modo, pesquisas por soluções viáveis para contornar tal problema, são de grande relevância (NITSCHKE e PASTORE, 2003).

Neste sentido, existem estudos que evidenciaram que a produção dos biosurfactantes pode ser afetada pela variação nas condições de processo à qual o microrganismo é submetido, afetando diretamente a produtividade e o composto formado. A quantidade de açúcar disponível, nitrogênio, resíduos solubilizados, temperatura, oxigênio, pH, agitação e quantidade de inóculo podem afetar o produto diretamente (ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFI & HASSOUNA, 2008).

Há uma grande variedade de microrganismos que produzem biosurfactantes com uma diversidade de características desejáveis e específicas para seu processo produtivo. Contudo o *Bacillus subtilis*, tem se destacado, visto que o biosurfactante, por ele produzido, possui propriedades tensoativas, como a surfactina (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

Portanto, torna-se interessante e importante o estudo para avaliar o processo de obtenção e purificação de biosurfactante utilizando o *Bacillus subtilis* e o melão como meio de cultura.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral obter, purificar e caracterizar o biosurfactante resultante da fermentação, empregando *Bacillus subtilis* como biocatalisador do processo e resíduo agroindustrial (melaço) como substrato em um biorreator batelada de bancada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparo do substrato a partir do melaço de cana-de-açúcar;
- Ativação do microrganismo e preparo do inóculo;
- Fermentação em biorreator de bancada para obtenção do biosurfactante;
- Acompanhamento do processo fermentativo;
- Purificação do biosurfactante obtido;
- Caracterização do biosurfactante;
- Análise de resultados;
- Escrita do relatório.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Surfactantes

A palavra surfactante provem da junção da expressão “*surface active agent*”, que significa agente de atividade superficial. Tais moléculas são anfipáticas, contendo uma parte polar e outra apolar, como mostra a Figura 1, que promovem a solubilização e a emulsificação de substâncias insolúveis reduzindo a tensão superficial, e desta forma, facilitando o seu processamento (GRIFFITHS et al., 2002).

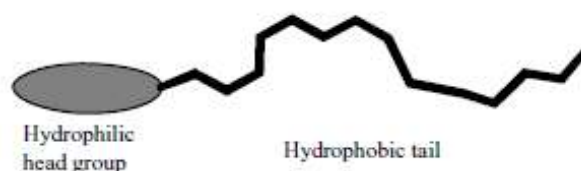


Figura 1 - Esquema ilustrativo de um surfactante.

Quando os surfactantes são adicionados em uma mistura contendo duas fases, como oleosa e aquosa, estes ficam na interface destas fases, reduzindo a tensão interfacial promovendo a emulsificação destas. Além disso, a emulsão ganha estabilidade, podendo ser usada em várias áreas, como a alimentícia (KROG, 1980).

Tais compostos anfifílicos possuem uma variedade de outras propriedades além da redução da tensão superficial, como descrito por Salager (2002):

- Formação de sabões e detergentes;
- Agentes de retenção;
- Agentes de dispersão;
- Emulsificante;
- Agente espumante;
- Agente bactericida;
- Agente com ação anticorrosiva;
- Agente anti-estático.

Contudo tais propriedades fazem com que o nome surfactante seja reconhecido por sua particularidade, de modo que Salager (2002) descreve que tais

compostos são capazes de formar estruturas poliméricas, microemulsivas, em forma de cristais líquidos, lipossomas, vesículas e até gelatinosas.

Os surfactantes podem ser de origem natural, como a lecitina obtida da soja, ou de origem sintética, como os derivados de petróleo. Atualmente são utilizados em larga escala como detergentes para limpeza e formulados com compostos sintéticos, sendo em torno de 6,550 milhões de libras demandadas em 2007 nos EUA para este uso (RUST e WILDES, 2008).

Diante dessa grande demanda, e do descarte destes em rios e lagos, em sua maior parte, sem o devido tratamento e, devido ao fato do surfactante sintético não ser biodegradável, houve a necessidade de substituir tais compostos de modo imediato (RUST e WILDES, 2008).

Assim, pesquisas foram realizadas para desenvolver um composto com características similares, porém biodegradável de modo a reduzir ou acabar com a poluição surgindo então compostos de origem natural (KROG, 1980).

Contudo a alta toxicidade residual e o custo elevado do processo de purificação destes tornou o seu uso restrito a grandes empresas e produtos para fins não alimentícios, necessitando assim de uma readaptação processual, elevando ainda mais os custos (RUST e WILDES, 2008).

Então muitas pesquisas acadêmicas foram desenvolvidas para solucionar tais problemas, surgindo então os biosurfactantes obtidos por rotas biotecnológicas que possibilitou ainda a ampliação de uso (NITSCHKE e PASTORE, 2003).

3.2. Biosurfactantes

Os biosurfactantes são compostos formados a partir de uma rota biotecnológica, que necessita de uma fonte de carbono associado a suplementações, capazes de exibir uma redução da atividade superficial, tendo como características fundamentais a baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, atendendo assim à demanda comercial em busca de alternativas naturais para substituir as sintéticas já existentes e amplamente utilizadas (BARROS et al., 2007).

Com a abertura para a pesquisa nesta área uma diversidade de microrganismos vem sendo relatados como produtores de biosurfactantes, que ainda não possuem uma exata função fisiológica explicitada. Porém estes biosurfactantes possui uma gama de características sendo estudadas conforme citado por NITSCHKE e PASTORE (2003), como:

- Agente emulsificante: auxilia na homogeneização de duas fases, lipo e hidrofílica, por possui ambas afinidades, atuando como intermediador;
- Agente solubilizante: auxilia na homogeneização de um composto pouco solúvel em um solvente qualquer;
- Agente de transporte de hidrocarbonetos: captura de compostos com maior afinidade a fim de retirar ou misturar tais no solvente;
- Agente aderente/liberador de células à superfície: adere em sua superfície compostos indesejáveis ou desejáveis na interface desta, de modo a reter ou liberar outras substâncias;
- Agente com atividade antibiótica: possui atividade de modo a reter o crescimento ou a destruir a camada lipoproteica de alguns microrganismos específicos, demonstrando assim sua ação antibiótica.

Assim, observa-se uma grande variedade de biosurfactantes, como mostra a Tabela 1 que apresenta alguns biosurfactantes obtidos e identificados em pesquisas e seus agentes produtores

Tabela 1 - Biosurfactantes listados na literatura junto a seus agentes produtores.

Biosurfactante produzido	Microrganismo (s) produtor (es)
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola, Torulopsis apícola.</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp</i>
Peptídeo-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	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>

Fonte: Adaptado de BANAT, 2000.

3.3. Aplicação dos biosurfactantes

Os biosurfactantes são empregados de acordo com seu grau de pureza, sua toxicidade, sua biodegradabilidade, sua ação específica e seu modo de preparação, deixando assim uma diversa área para aplicação, como em indústrias petroquímicas, alimentícias, de cosméticos, biorremediação, farmacêutica, metalúrgica, de recuperação de petróleo, de mineração e até mesmo em agroindústrias (NITSCHKE & PASTORE, 2003).

A indústria alimentícia vem sendo focada para o uso de biosurfactantes, onde estes podem atuar como agentes emulsificantes sobre gorduras, melhorar a consistência de produtos panificados e também no processamento de derivados de carne, auxiliando assim na melhora de consistência e textura destes (KROG, 1980).

A limitação da aplicação destes na indústria alimentícia se encontra em dois aspectos básicos, segundo Alves (2013), que são:

- Quanto ao grau de pureza: os biosurfactantes obtidos possuem uma quantidade muito grande de resíduos e produtos aderidos provenientes da fermentação, necessitando de vários tratamentos para a obtenção de um produto com alto grau de pureza, que possa ser administrado em uma indústria de alimentos, aumentando o custo produtivo;
- Quanto ao custo produtivo: a produção dos biosurfactantes é de custo extremamente elevado, devido aos vários tratamentos, pré e pós fermentativos, para a obtenção de um produto de alto grau de pureza.

Além da área alimentícia, Muligan (2005) descreveu inúmeras vantagens do uso dos biosurfactantes na área ambiental, onde estes aceleram a degradação microbiana de óleos e biorremediam águas e solos contaminados.

3.4. Produção de biosurfactantes pelo gênero *Bacillus*

Segundo Abdel-Mawgoud, Abouwafa & Houssana (2008) *Bacillus subtilis* é um dos microrganismos produtores de surfactina. Este microrganismo é facilmente

encontrado no solo e na água, pertence ao grupo gram positivo, com capacidade de formar endosporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos, variando drasticamente o produto reacional quanto a variações de pH, temperatura, fonte de carbono, oxigênio e osmolaridade. Tais produtos e tipos de reação podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Tipo de reação, reagentes e produtos formados pelo gênero *Bacillus*.

Tipo de reação	Reagentes	Produtos
Putrefação	Alimentos proteicos e microrganismos proteolíticos.	Aminoácidos, aminas, amônia e sulfeto de hidrogênio.
Fermentação	Alimentos carboidratados e microrganismos sacarolíticos.	Ácidos, álcoois, gases e outros compostos aromáticos.
Rancidez	Alimentos gordurosos e microrganismos lipolíticos.	Ácidos graxos e glicerol.

Fonte: PELCZAR, CHAN & KRIEG, 1997

3.5. A Surfactina

A surfactina é um composto obtido por via fermentativa utilizando por exemplo, *Bacillus subtilis* como agente precursor do metabólito. Tal composto é formado por um heptapeptídeo e um ácido graxo β -hidroxilado com variação de 13 a 15 átomos de carbono podendo ser visualizado na Figura 2 (SOARES, 2014).

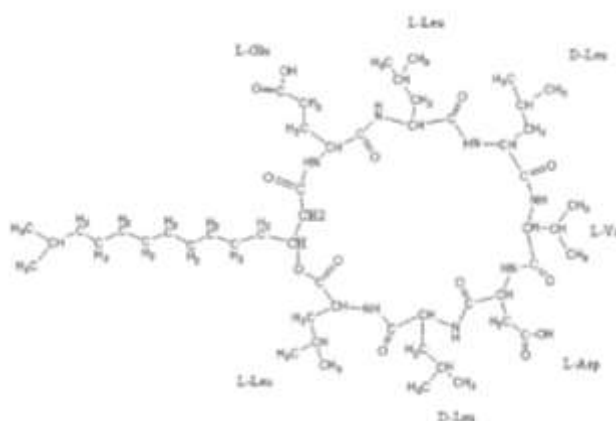


Figura 2 - Estrutura da principal isoforma da surfactina (BARROS et al., 2007)

Analisando a estrutura da surfactina apresentada na Figura 2 pode-se notar a presença do corpo e cabeça, típico de uma estrutura que pode ser utilizada em emulsões, devido a sua característica anfifílica, ou seja, atuar como agente emulsificante e solubilizante, como por exemplo água e óleo (JUNIOR, 2012).

A surfactina possui uma alta biodegradabilidade, detergência, capacidade espumante, solubilização, formação de emulsões estáveis, redução da tensão superficial e pode ser utilizada em uma ampla faixa de pH, sem alterar suas características (BARROS, 2007).

Apesar dessa gama de características seu uso ainda é de baixa escala na área alimentar, sendo que o seu ímpeto está na produção de biofilmes, de modo que ela reduz a aderência de patógenos na superfície de alimentos, conforme descrito por Gomes e Nistschke (2012).

Com todas estas propriedades a surfactina é considerada o mais poderoso dos biosurfactantes, tendo uma ampla utilização em indústrias petroquímicas, farmacêuticas, sendo utilizada como agente de retenção de vazamentos e agente antibiótico, respectivamente, contudo esta necessita de maior atenção quanto ao processo de obtenção e recuperação, devido ao seu alto custo de produção (VENDARAMAN E VENKATESH, 2011).

Neste sentido, uma das possibilidades de redução de custo seria o emprego de um resíduo industrial que forneça condições básicas para o desenvolvimento do microrganismo e também para a formação do produto metabólito ao longo do tempo reacional, conforme descrito por Barros et al. (2007).

3.6. Alternativas para o substrato

O Brasil é um país onde a economia é muito dependente da produção agrícola em larga escala, possuindo assim uma ampla variedade de subprodutos agroindustriais, provenientes de fontes alternativas como, por exemplo, o melaço, subproduto da industrialização da cana-de-açúcar, que é fonte de carbono podendo ser utilizado em processos fermentativos (NEVES, 2007).

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de buscar fontes alternativas como substrato. Acioly (2009) reportou o uso de três tipos de resíduos industriais: um proveniente da indústria cerealífera logo após o processamento do arroz, onde foi utilizada a farinha da casca em solução suplementada; o segundo proveniente da água em que ocorre a remoção das sujidades presentes na batata, possuindo resíduos de amido dissolvido adicionado de suplementação; e o terceiro, grãos de soja que submetidos à fermentação em meio aquoso suplementado. Em todos os casos houve a formação de biosurfactante, contudo no segundo e terceiro foi evidenciado e comprovado a presença da surfactina.

Marim (2014) estudou o uso do melaço diluído, pré-tratado e suplementado para produzir biosurfactante e sugere a presença da surfactina como produto.

Estudando o melaço suplementado, a farinha de varredura e a água de lavagem de batatas Abdel e colaboradores (2008), reportaram maior concentração de surfactina após o bioprocessamento, quando se utilizou o melaço suplementado em comparação ao produto obtido pela fermentação da varredura de farinha e da água de lavagem de batatas.

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo do Meio de Cultura

O substrato empregado foi o melaço de cana-de-açúcar, cedido pela empresa USAÇÚCAR - Usina Santa Teresinha, localizada na cidade de Maringá em julho de 2015.

O substrato foi preparado, conforme mostra a Figura 3, através de uma solução aquosa à 10% (m/v) de melaço em água destilada, conforme Marim (2014). Após o preparo da solução de melaço esta passou por um processo de hidrólise enzimática da sacarose em açúcares redutores utilizando invertase (Sigma), conforme metodologia descrita por Oliveira (2009), utilizando 0,1 grama de invertase (grau de pureza VII com 300 UI/mg) para promover a hidrólise 1,5 litros de solução de melaço à 10% (m/v) em pH ajustado para 4,55 e temperatura de 55°C. Após o processo a solução foi aquecida à 100°C para inativação da enzima.

Segundo a CNNPA n° 12/78 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária o melaço é definido como líquido residual de indústria de açúcar cristalizado com coloração escura que, para ser utilizado como meio fermentativo, deve ser clarificado, para que não haja interferentes diretos que possam afetar o bioprocessamento.

Deste modo a solução de melaço hidrolisada passou por um pré-tratamento, conforme proposto por Valduga (2005), utilizando 8% (m/v) de carvão ativado por 1 hora sob agitação à 90°C, seguindo-se centrifugações e ultrafiltração por membrana (Módulo de Membrana-Pam) para retirada do carvão e das impurezas adsorvidas neste.

À solução de melaço clarificada adicionou-se extrato de levedura a 1% e peptona 1%, ajustou-se o pH para 6,8, conforme dados obtidos experimentalmente por Marim (2014), e então a solução foi colocada em frascos de vidro com tampa e esterilizados à 121°C e 1atm por 15 minutos.

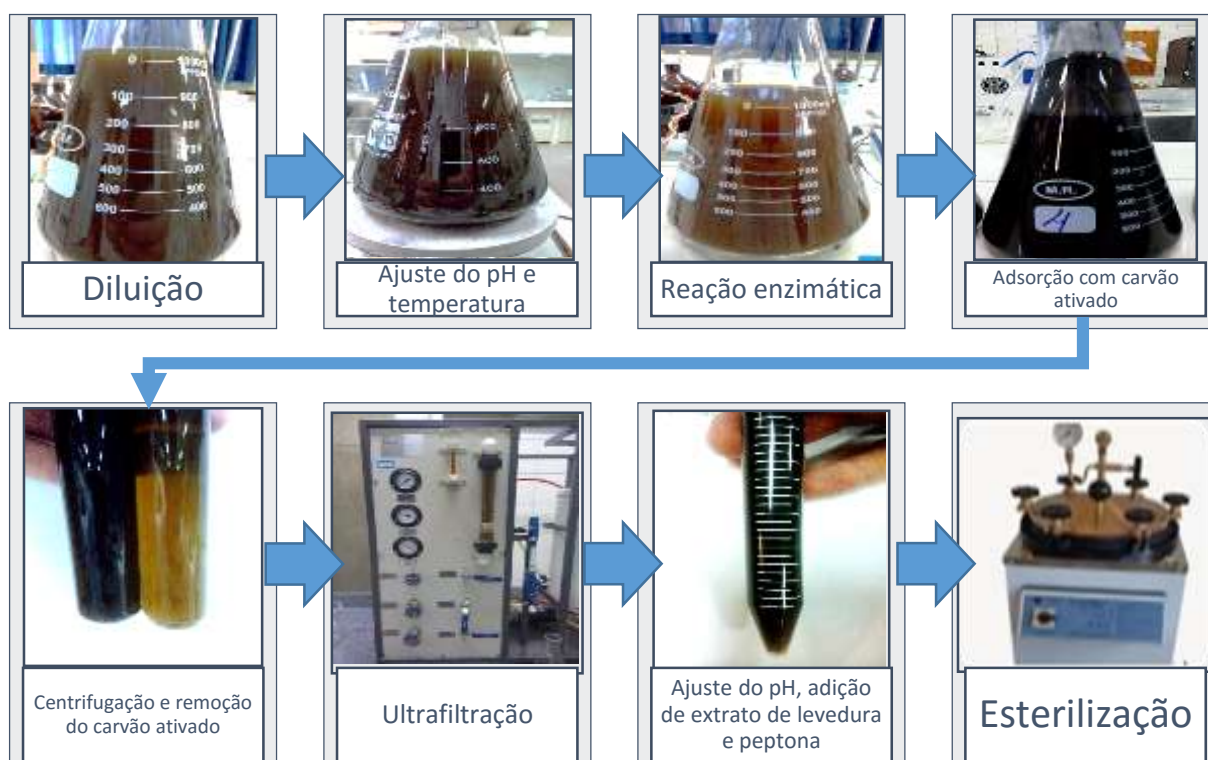


Figura 3 - Esquema ilustrativo com as etapas do pré-tratamento do melão.

Para caracterizar o substrato, durante o pré-tratamento, foram feitas análises de açúcares redutores (AR), conforme descrito por Maldonado e colaboradores (2013).

4.2. Aquisição, ativação do microrganismo e preparo do inóculo

A bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 9372, utilizada para obtenção do biosurfactante, foi doada em agosto de 2015 pela empresa Clean-up Brazil Biotecnologia, localizada na cidade de Campo Mourão – PR, na forma de uma tira de papel/suporte onde o microrganismo encontra-se seco e esporulado.

Para ativar, manter e padronizar o microrganismo (*Bacillus subtilis*) que se encontrava na forma de esporos secos, fez-se o procedimento conforme a Figura 4, em duplicata. Todos os materiais e soluções utilizados neste processo foram

esterilizados antes e após o uso. Entre cada etapa o inóculo foi incubado em estufa bacteriológica a 35°C.

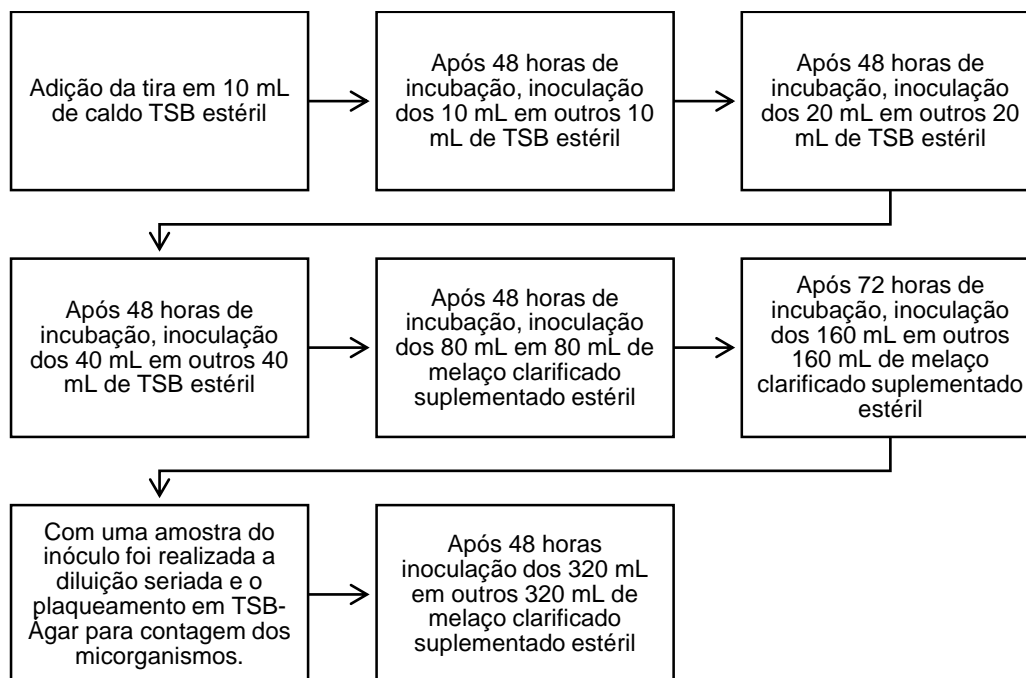


Figura 4 - Esquema ilustrativo do procedimento de ativação e preparação do inóculo do microrganismo.

Legenda: TSB - “*Tryptone Soy Broth*” é a fonte nutriente utilizada para o cultivo e desenvolvimento de microrganismos, como o *Bacillus subtilis*, composto por nitrogênio, carbono, cloreto de sódio e fosfato-dipotássio.

TSB – ágar: *Tryptone Soy Broth* adicionado *ágar-ágar* (agente geleificante) para o plaqueamento e posterior incubação.

A fim de visualizar a forma do microrganismo utilizado, tal como a ausência de contaminação, realizou-se o esfregão de 1 mL do inóculo em lâmina seguida dos procedimentos para a obtenção da coloração gram, conforme metodologia descrita por Silva e colaboradores (1997).

4.3. Produção do Biosurfactante

A fermentação ocorreu em um biorreator de bancada (Fabricante: Tecnal, modelo TEC-BIO 7 litros vidro-inox), que possui em seu conjunto módulos de aeração, bombas peristálticas para adição de nutrientes, base, ácido e antiespumante, banho

termostático, controladores e sensores acoplados em um vaso reacional encamisado. O sistema também conta com um condensador que utiliza sistema de serpentina para troca de calor, de modo que o coletado se dissipe e seja lançado nos coletores. Tal sistema pode ser visualizado na Figura 5.

Antes de iniciar o processo o vaso reacional e de seus sensores de contato direto foram esterilizados em autoclave vertical (marca Labstore, modelo AV SD), conforme descrito no manual do equipamento.

Seguidamente, em ambiente estéril, foi adicionado ao vaso reacional estéril o meio de cultura estéril e o inóculo, preparado conforme item 4.2., sendo que o volume de inóculo utilizado foi de 20% em relação ao volume total de trabalho. Posteriormente foi realizada a vedação e fechamento do vaso, tal como a alocação dos sensores e dispositivos para o funcionamento do reator e posterior o sistema foi ativado para manter as condições de temperatura (36°C) e agitação (160 rpm).



Figura 5 - Imagem ilustrativa do biorreator TEC-BIO 7 litros vidro-inox.

Ao longo do processo fermentativo o próprio equipamento determinava o pH, e eram coletas assepticamente amostras do caldo para avaliar a quantidade de biomassa e a concentração de AR.

4.4. Processo de Purificação do Biosurfactante

Durante o processo fermentativo foram feitas também verificações em relação à quantidade de biosurfactante produzido, empregando a técnica de borbulhamento ou flotação do caldo fermentativo conforme reportado por Alves (2013) para recuperar e purificar o biosurfactante. Para tanto, o módulo de aeração presente no biorreator foi ajustado para uma vazão de 5L/min. e a agitação foi aumentada para 300 rpm, esse processo provocou a formação de bolhas de biosurfactante que foram coletadas em um recipiente fechado e estéril, após serem liquefeitas pelo condensador, acoplado, através de mangueiras de silicone estéreis, a outro recipiente de menor pressão, para a coleta do segundo borbulhamento, suprido de filtros de ar nas entradas e saídas do sistema, impossibilitando a entrada de microrganismos e protegendo a amostra e o vaso reacional. Tal pressão é ajustada automaticamente pelo controlador, de acordo com os dados fornecidos pelo usuário através do software do equipamento.

Após a recuperação do biosurfactante, pelo processo de borbulhamento, seguiu-se a purificação utilizando a metodologia proposta por Sobrinho et al. (2007), modificada, onde a solução de biosurfactante, teve o pH ajustado para 2,0 com HCl 6 mol/L, seguida da adição de 2 volumes de metanol a cada volume de amostra. Posteriormente o sistema foi homogeneizado, fechado e mantido em repouso a 0°C por 24 horas, para que houvesse a precipitação do biosurfactante. Após este período, o material foi centrifugado por 30 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com metanol gelado. Tal procedimento foi feito por duas vezes e em seguida o precipitado foi seco no tubo em estufa à 37°C até atingir peso constante e posteriormente mantido em dessecador.

Diante da necessidade de ampliar a concentração de produto recuperado e purificado, bem como utilizar um solvente menos agressivo após o borbulhamento na etapa de purificação, foram realizados testes com diferentes métodos de recuperação e purificação.

O primeiro teste foi para comparar a concentração de produto, AR e biomassa, do meio reacional sem borbulhamento e com borbulhamento, e verificar as

informações descritas por Alves (2013) sobre a eficiência do processo de recuperação e purificação do biosurfactante por borbulhamento em relação ao sem borbulhamento.

O segundo teste foi o comparativo quanto a purificação utilizando um solvente menos agressivo, substituindo o metanol pelo etanol, com o borbulhamento previamente realizado, sugestão dada pela banca examinadora na apresentação do projeto de TCC.

4.5. Determinações analíticas

As determinações analíticas foram realizadas a cada 12 horas de fermentação, conforme descrição abaixo.

pH: determinado em pHmetro de Bancada Digital 0/14 Ph (Tecnocon) calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0 a cada intervalo.

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), utilizando 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 preparou-se soluções diluídas com concentrações previamente conhecidas. Após o preparo destas, retirou-se 1mL de cada solução e alocadas em um tubo de ensaio identificado, adicionou-se 1 mL do reagente de DNS, agitou-se e estes foram aquecidos em banho-maria a 100°C (em ebulição) por 5 minutos. Após, estes foram resfriados por 5 minutos em banho de gelo e adicionou-se 16 mL da solução de tartarato duplo de sódio e potássio. Posteriormente foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (OCEAN OPTICS, UV-RED TIB USB 650 UV) à 540 nm. A solução branca utilizada foi a água destilada reacionada com o reagente de DNS, aquecida a 100°C e resfriada em gelo, seguida da adição de tartarato duplo de sódio e potássio. Após obter as leituras de absorbância para cada solução preparada construiu-se a curva de calibração de concentração de açúcar redutor (AR) por absorbância, obtendo-se uma correlação linear através do programa Microsoft Excel 2013. Gerou-se a equação da reta, a qual foi utilizada para a determinação da concentração de açúcar redutor no meio pré-tratamento, durante 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 retirou-se 1,0 mL do sobrenadante para a determinação de AR pela metodologia do DNS.

Determinação de biomassa (massa celular seca): foi utilizado o precipitado obtido no item de determinação de AR, proveniente da centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. O tubo da centrífuga foi previamente seco, resfriado e pesado. Após a centrifugação a massa foi lavada com água destilada e centrifugada, realizando tal procedimento duas vezes. Então o tubo foi colocado em estufa a 60°C por 24 horas, resfriado e mantido em dessecador e pesado para o cálculo da biomassa seca. A massa celular seca foi calculada pela diferença entre a massa do tubo com biomassa seca e a massa do tubo vazio.

Determinação de produto formado (biosurfactante seco): realizado conforme descrito no item 4.4. O peso pode ser obtido pela diferença entre o peso do tubo contendo o produto com o tubo sem o produto.

4.6. Cálculo dos fatores de conversão e produtividade

Diante da alteração das variáveis ao longo do bioprocessamento, substrato, produto e biomassa, avaliou-se o quanto de substrato foi convertido em produto e o quanto de células foram necessárias para a formação do produto.

Deste modo é possível obter o rendimento e avaliar a produtividade da fermentação, descritas nos itens abaixo mencionados.

4.6.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto (g/g)

O fator de conversão de Substrato em Produto é definido através da relação apresentada na Equação 1.

$$\gamma_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (1)$$

$\gamma_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto (g/g)

ΔP : variação da concentração de produto formado (g/L);

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

4.6.2. Fator de conversão de células em produto (g/g)

O fator de conversão de células em produto é definido através da relação apresentada na Equação 2.

$$\gamma_{X/P} = \frac{\Delta X}{\Delta P} \quad (2)$$

$\gamma_{X/P}$: fator de conversão de células em produto (g/g)

ΔP : variação da concentração celular (g/L);

ΔX : variação da concentração de produto formado (g/L);

Deste modo obteve-se um fator de conversão de gramas de células por grama de produto formado.

4.6.3. Produtividade

A produtividade é obtida pela relação entre a concentração obtida (em g/L) pelo tempo de processo, conforme descrito na equação 3.

$$Produtividade = \frac{\text{concentração de biosurfactante}}{\text{tempo decorrido}} \quad (3)$$

4.7. Caracterização do Biosurfactante

4.7.1. FT IR

Segundo Banat, Makkar e Cameotra (2000), a caracterização química do biosurfactante foi realizada através da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (TFIR) na faixa de 4000-400 cm^{-1} em espectrofotômetro

Shimadzu IR Affinity⁻¹. Para a realização da análise foram preparadas pastilhas de KBr contendo 0,2 mg do biosurfactante, submetida à análise de absorvância no FTIR. Os dados obtidos foram tratados no software Origin 6.0.

4.7.2. Aplicação: atividade emulsificante e estabilidade da emulsão

Em tubo do tipo “falcon” preparou-se mistura de água e óleo na proporção volumétrica 1:1; à esta mistura foi acrescentado 6 mg do biosurfactante, recuperado e purificado com metanol e, com etanol, para avaliar se o solvente influencia na estabilidade da emulsão formada, então os tubos foram agitados em “vortex”. A estabilidade das fases da emulsão formada foi analisada para os sistemas ao longo de três dias, com a quantificação do tamanho e quantidade de partículas em um espaço estabelecido através do microscópio óptico conforme sugerido por Paulin (2013).

A atividade emulsificante dos compostos foi avaliada também, onde foi realizada a mistura de óleo e água na proporção volumétrica 1:1, mensurando, ao longo do tempo, o volume das fases e comparado os resultados com a lecitina, conforme descrito por Almeida (2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultado da construção da curva de calibração para a determinação de AR

Para o acompanhamento da concentração de açúcares redutores, realizou-se a construção de uma curva de calibração, obtendo um grau de confiança de 0,998 com a equação de reta $y=2,061x + 00467$. Tais dados e regressão linear estão dispostos no anexo 1.

Analisando o anexo 1 e realizando a regressão linear dos dados, observa-se que a equação de reta apresentou um coeficiente de correlação R^2 de 0,998, sendo que quanto mais próximo a 1 melhor é a correlação linear dos dados, então pode-se sugerir que foi obtida um bom ajuste linear para os dados e assim a equação obtida foi utilizada nas análises de AR para obter a concentração deste em g/L com a absorbância obtida em 540 nm.

5.2. Resultado do preparo e caracterização do substrato

Para a avaliação do pré-tratamento do melaço foi realizado o acompanhamento dos açúcares redutores presente nas amostras a cada procedimento, não podendo ter reduções drásticas, pois a fonte de carbono deve oferecer aos microrganismos as condições ideais para o bioprocessamento. Com isso, obteve-se, utilizando o método do DNS e a equação de reta mostrada no anexo 1, os resultados demonstrados nas Figuras 6 e 7, e 8 respectivamente.



Figura 6 - Pré-tratamento do melaço diluído (Sendo da esquerda para a direita: Diluição do melaço a 100 g/L; Ajuste térmico à 55°C; Ajuste do pH para 4,55; 5 minutos de reação enzimática; 10 minutos de reação enzimática; 20 minutos de reação enzimática).



Figura 7 - Pré-tratamento do melão diluído (Sendo da esquerda para a direita: 30 minutos de reação enzimática; 40 minutos de reação enzimática; 60 minutos de reação enzimática; 80 minutos de reação enzimática; após tratamento com carvão ativado 80 gramas por litro de solução submetido à 90°C por 1 hora; após ultrafiltração em temperatura ambiente; após esterilização a 121°C por 15 minutos).

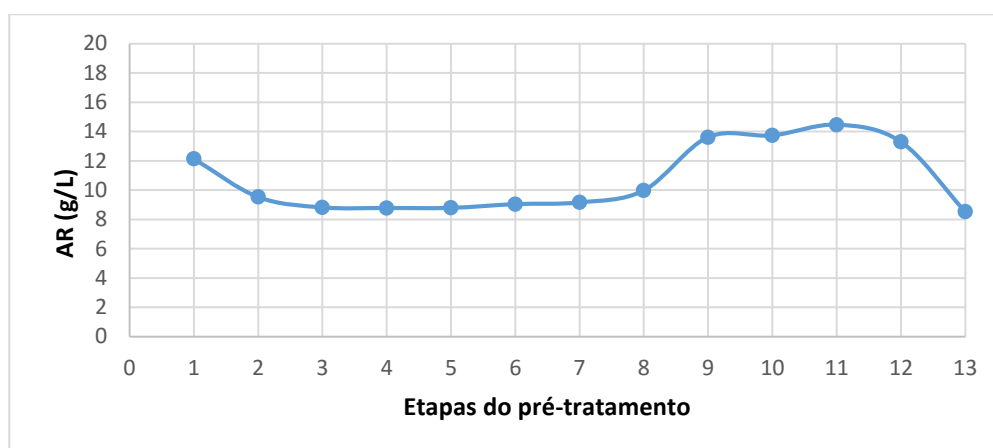


Figura 8- Concentração de AR (g/L) no período de pré-tratamento do caldo.

Etapas do pré-tratamento: (1) Diluição do melão a 100 g/L; (2) Ajuste térmico à 55°C; (3) Ajuste do pH para 4,55; (4) 5 minutos de reação enzimática; (5) 10 minutos de reação enzimática; (6) 20 minutos de reação enzimática; (7) 30 minutos de reação enzimática; (8) 40 minutos de reação enzimática; (9) 60 minutos de reação enzimática; (10) 80 minutos de reação enzimática; (11) Após tratamento com carvão ativado 80 gramas por litro de solução submetido à 90°C por 1 hora; (12) Após ultrafiltração em temperatura ambiente; (13) Após esterilização a 121°C por 15 minutos.

Analisando o gráfico da Figura 8 é possível ver que a quantidade de AR foi modificada gradativamente a cada processo e, pelas Figuras 6 e 7 observa-se a clarificação da solução de melão devido a remoção de impurezas e resíduos provenientes do tratamento da obtenção de açúcar e álcool na indústria sucroalcooleira.

Pode-se notar também que a enzima conseguiu realizar a hidrólise chegando a uma concentração constante de AR após 80 minutos de reação, resultado similar foi obtido por Oliveira (2011).

Porém pode-se observar decréscimo na concentração de AR após o tratamento de clarificação que também foi observado por Valduga (2005), concordado com o resultado deste trabalho.

Foi possível ainda notar que a esterilização foi responsável pela maior perda de açúcares, sendo que a adição de aminoácidos provenientes do extrato de levedura, em conjunto com os açúcares redutores e a alta temperatura da esterilização por longo período, pode ter proporcionado a formação de compostos como a melanoidina, reduzindo assim a quantidade de açúcar disponível e escurecendo o substrato, evidenciado na Figura 8 (DAMODARAN, PARKIN & FENNEMA, 2010; SINGH, VAN HAMME & WARD, 2006).

5.3. Resultado do preparo e caracterização do inóculo

Após a ativação e preparo do inóculo conforme metodologia descrita no item 4.3, foi realizada diluição seriada e plaqueamento em profundidade para a contagem do microrganismo.

Como resultado da média das duplicatas referentes à contagem de colônias nas placas de diluição seriada obteve-se $2,0 \times 10^4$ UFC/mL de *Bacillus subtilis* superior àquele obtido por Abdel-Mawgoud (2008), sugerindo um bom desenvolvimento do microrganismo no meio de cultura empregado para a fermentação.

Para ter certeza de que a fermentação estaria livre de contaminantes foi realizada a visualização em lamina utilizando a técnica de coloração gram, no inóculo. O resultado pode ser observado na Figura 9, que demonstra a presença apenas do *Bacillus subtilis*.



Figura 9 – Imagem de *Bacillus subtilis* coloridos pela técnica de Gram observados em microscópio óptico com aumento de 100X.

5.4. Resultados das determinações analíticas durante o bioprocesso

A Tabela 3 e as Figuras de 10 e 11 apresentam os resultados das análises de pH, concentração de biomassa seca, AR e biosurfactante durante o processo fermentativo.

Tabela 3 - Resultados das análises de pH, concentração de biomassa, AR e produto (biosurfactante) durante o processo fermentativo.

Tempo (horas)	pH	Concentração de biomassa (g/L)	Concentração de açúcar (g/L)	Concentração de Produto (g/L)
0	6,68	0,20	8,51	1,36
12	6,43	0,26	7,43	1,40
24	6,37	0,49	6,19	1,73
36	5,85	0,56	4,54	2,50
48	4,85	0,67	3,67	2,52
60	4,38	1,50	3,29	2,44
72	4,32	1,83	2,89	2,30
84	4,42	1,80	2,73	2,74
96	4,35	2,03	2,49	2,89
108	4,36	2,30	2,34	3,85
120	4,4	2,10	2,35	3,70
132	4,37	1,52	2,29	4,33
144	4,43	1,20	2,27	3,83

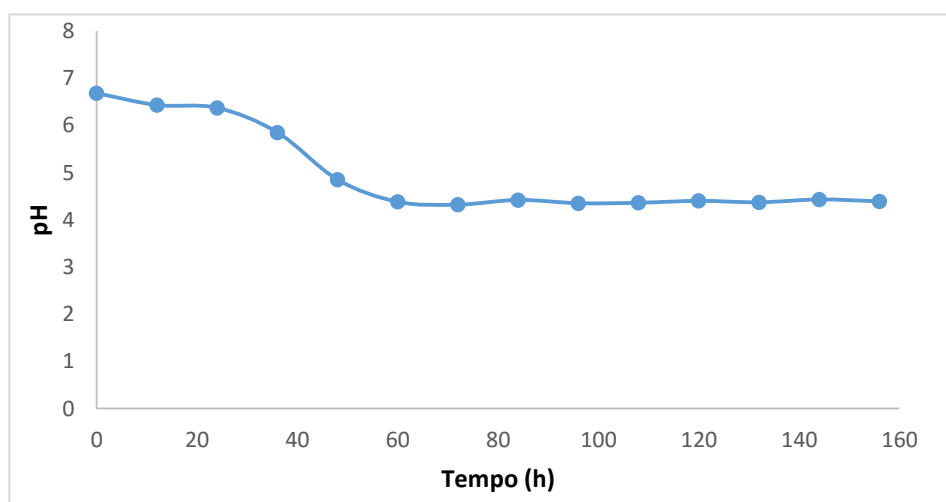


Figura 10 – Resultado da análise de pH (eixo y) durante o processo fermentativo (em horas).

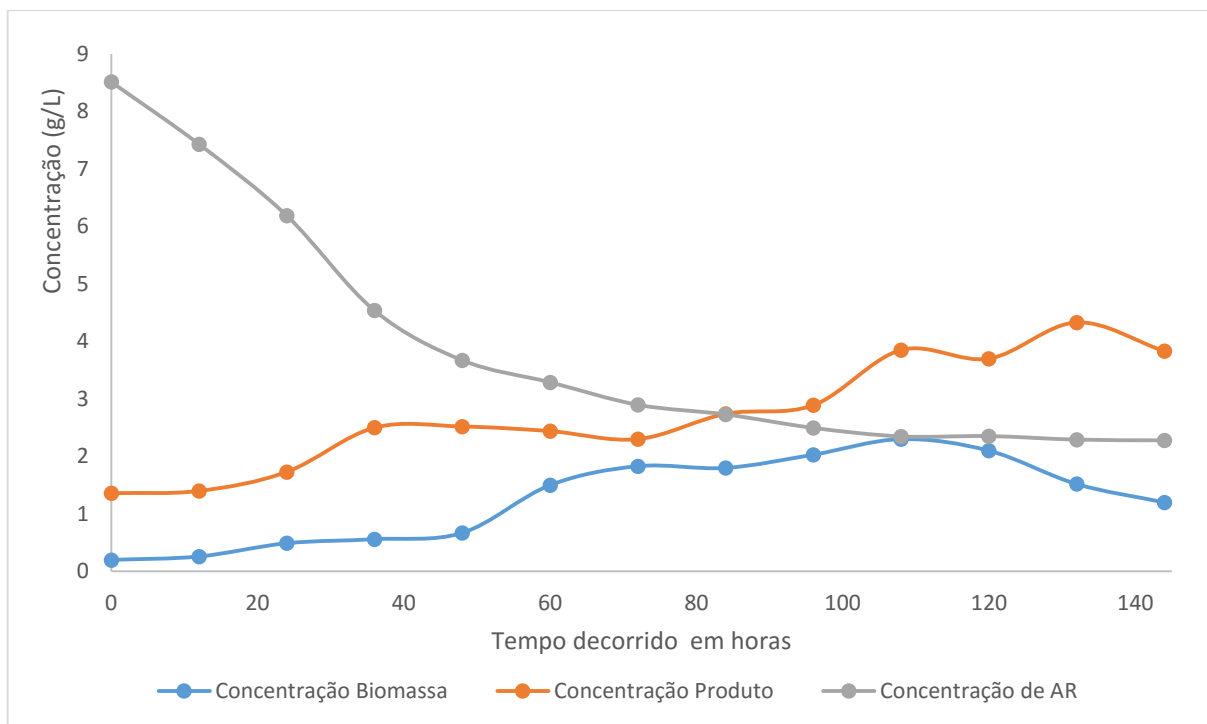


Figura 11 - Resultado da concentração de biomassa seca, AR e produto formado em (g/L) no decorrer do processo fermentativo.

Analisando a Tabela 3 e a Figura 10 pode-se observar que o pH inicial 6,8 diminuiu durante o processo com um decréscimo mais acentuado entre 24 e 60 horas de processo e depois desse período ficou relativamente estável em torno de 4,4. Esse fato também foi observado por MARIM (2014) que reportou redução no pH para valores próximos a 4,5, concordando com o resultado deste trabalho.

Tal redução de pH pode ser devido ao fato de que durante o processo, o *Bacillus subtilis* produziu outros metabólitos com caráter ácido, assim propiciando a redução do pH do meio de cultura, conforme também descrito por MARIM (2014).

Analisando a Tabela 3 e a Figura 11 pode-se observar que a concentração de AR reduziu, indicando que os microrganismos o utilizaram para a formação de metabólitos e multiplicação, que pode ser comprovado pela Figura 11, que demonstra as curvas de crescimento microbiano crescente e concentração de biosurfactante crescente ao longo do processo.

Durante o bioprocessamento pôde-se notar que a coloração do substrato alterou, bem como, aumentou a turbidez do meio, o que pode indicar a presença de metabólitos e também de microrganismos, dispersos e dissolvidos. Tal resultado pode ser evidenciado pela Figura 12.



Figura 12 – À esquerda: amostra retirada antes do bioprocesso límpido e com coloração escura. A direita: Biorreator com substrato turvo e de coloração diferente, comparada à inicial.

Observando os resultados de aumento de biomassa e de concentração de biosurfactante apresentados na Tabela 3 e Figura 11, pode-se dizer que as condições de processo e meio de cultura foram adequadas para promover o crescimento do microrganismo e produção do biosurfactante. Observa-se também que o período de maior decréscimo de pH coincide com o período de adaptação do microrganismo.

Com isso pode-se dizer que a concentração de biosurfactante e AR apresentam uma tendência em permanecer constante na fase de declínio do microrganismo, demonstrando um processo fermentativo típico.

5.5. Resultados das análises dos diferentes métodos de recuperação e purificação utilizados

A Tabela 4 apresenta a concentração de biosurfactante obtido através dos diferentes métodos de recuperação e purificação.

Tabela 4 - Resultados da concentração de biosurfactante, biomassa e açúcares redutores com a variação da metodologia aplicada.

Tratamento	Produto formado	Biomassa	Açúcares redutores
Sem borbulhamento e com purificação metanólica	3,01 g/L	1,25 g/L	1,494 g/L
Com borbulhamento simples e purificação metanólica	3,83 g/L	1,25 g/L	2,298 g/L
Com borbulhamento duplo e purificação metanólica	7,187 g/L	1,25 g/L	1,851 g/L
Com borbulhamento duplo e purificação etanólica	7,118 g/L	1,25 g/L	1,851 g/L

A partir da análise dos resultados da Tabela 4 pode-se concluir que o borbulhamento duplo aumentou significativamente a concentração do produto recuperado, contudo a biomassa também foi levada pelo arraste das bolhas.

De acordo com Soto (2011) a adsorção permite que haja uma recuperação e concentração de compostos a partir de soluções diluídas, sendo de baixo custo, fácil operação e alta capacidade, dependendo exclusivamente do diâmetro da bolha formada e das condições reais a que estão submetidos os compostos solúveis.

Com a formação das bolhas e o arraste dos compostos de interesse é necessário que haja a ruptura destas, que segundo Figueiredo (1999), acontece de modo natural, sem intervenção externa, podendo ser acelerado com uma queda de pressão, que foi utilizado nesse caso, logo após a espuma formada passar pelo condensador.

A partir da Tabela 4 também se observa que o etanol foi eficiente no processo de purificação, podendo-se sugerir que este solvente pode ser uma alternativa ao uso do metanol, visto que este é tóxico e poderia ser um entrave para a utilização do biosurfactante purificado com ele, em algumas aplicações, como por exemplo, na área alimentícia.

Diante da análise da Tabela 4 obteve-se uma concentração de 7,187 g/L de produto, já o obtido por Marim (2014), perante as mesmas condições deste trabalho,

exceto o borbulhamento, foi de 3,65 g/L e o obtido por Abdel-Mawgoud e colaboradores (2008), com as condições impostas por eles com modificação de nutrientes e minerais e sem o borbulhamento, foi de 1,12 g/L. Com isso o bioprocesso teve um maior concentração de produto final, quando comparado aos obtidos pelos autores citados, demonstrando que os tratamentos realizados evidenciando uma maior eficiência quanto à massa obtida ao final de 144 horas submetido aos procedimentos citados anteriormente, e diferindo dos aplicados pelos pesquisadores anteriormente listados.

5.6. Cálculo dos fatores de conversão e produtividade

Diante dos resultados obtidos anteriormente pode-se calcular, através das equações apresentadas nos itens 4.6.1, 4.6.2 e 4.6.3, os fatores de conversão de substrato em produto e de células em produto, além da produtividade quanto às metodologias utilizadas, explícitas no item 4.4, a fim de avaliá-las e demonstrar qual a melhor técnica obtida por este trabalho. Tais resultados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Fatores de conversão e produtividade calculados.

Método utilizado	$Y_{P/S}$	$Y_{X/P}$	Produtividade (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)
Sem borbulhamento com purificação metanólica	0,37760	0,3977	0,027847
Com borbulhamento simples e purificação metanólica	0,50178	0,3377	0,031097
Com borbulhamento duplo e purificação metanólica	0,87480	0,1804	0,04991
Com borbulhamento duplo e purificação etanólica	0,86445	0,1825	0,049431

Analisando a Tabela 5, pode-se notar que a metodologia utilizando borbulhamento duplo com purificação metanólica obteve maiores fatores de conversão e, conseqüentemente, uma maior produtividade. Contudo a metodologia

utilizando borbulhamento duplo com purificação etanólica obteve resultados similares, assim podendo também ser aplicada.

Pode-se notar também que a metodologia utilizando borbulhamento duplo com purificação metanólica obteve uma maior produtividade, sendo de 0,0499, quando comparado aos obtidos por Marim (2014), sendo de 0,0254 a produtividade, evidenciando que a metodologia utilizada neste trabalho demonstrou ser mais efetiva quanto a recuperação do produto e produção ao longo do tempo do bioprocessamento.

5.7. Análise da espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

A fim de verificar se o biosurfactante produzido é a surfactina, realizou-se a análise das bandas do espectro obtido pelo FTIR, utilizando os produtos formados pela recuperação com ou sem borbulhamento e purificação metanólica ou etanólica, e comparou-as com os obtidos na literatura.

Para a análise dos espectros de FTIR utilizou-se a Tabela 6 e a Figura 13 que apresentam os grupamentos característicos e os espectros de FTIR da surfactina padrão (Sigma Aldrich, 95% de pureza) e do biosurfactante obtido por Soares (2014).

Tabela 6 - Grupamentos base para a identificação da surfactina através da análise de espectro obtido por FTIR, segundo SOARES (2014).

Grupo	Comprimento de onda evidente em cm⁻¹
NH	3310
CO	1655
CN	1534
Carbonil éster	1730

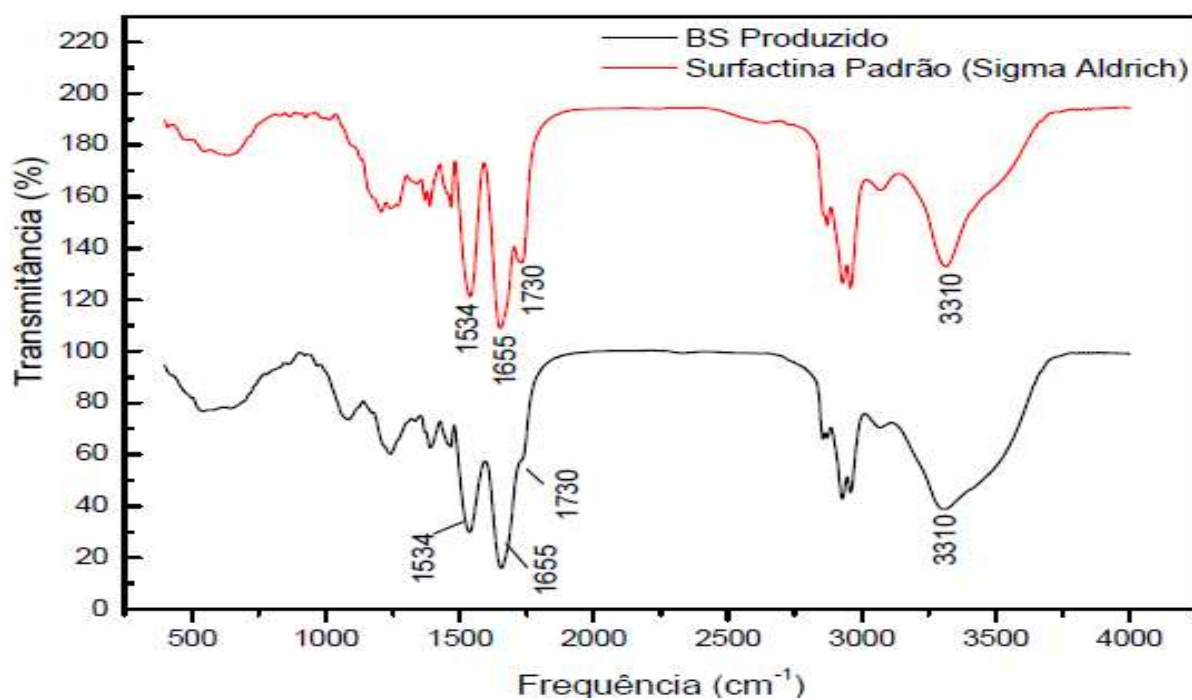


Figura 13 - Espectrogramas vibracionais obtidos por FTIR Sigma Padrão e o obtido por SOARES (2014) dialisada e liofilizada, excretada por *B. subtilis*, cultivada em meio mineral, a 30°C, 150 rpm, 48 horas.

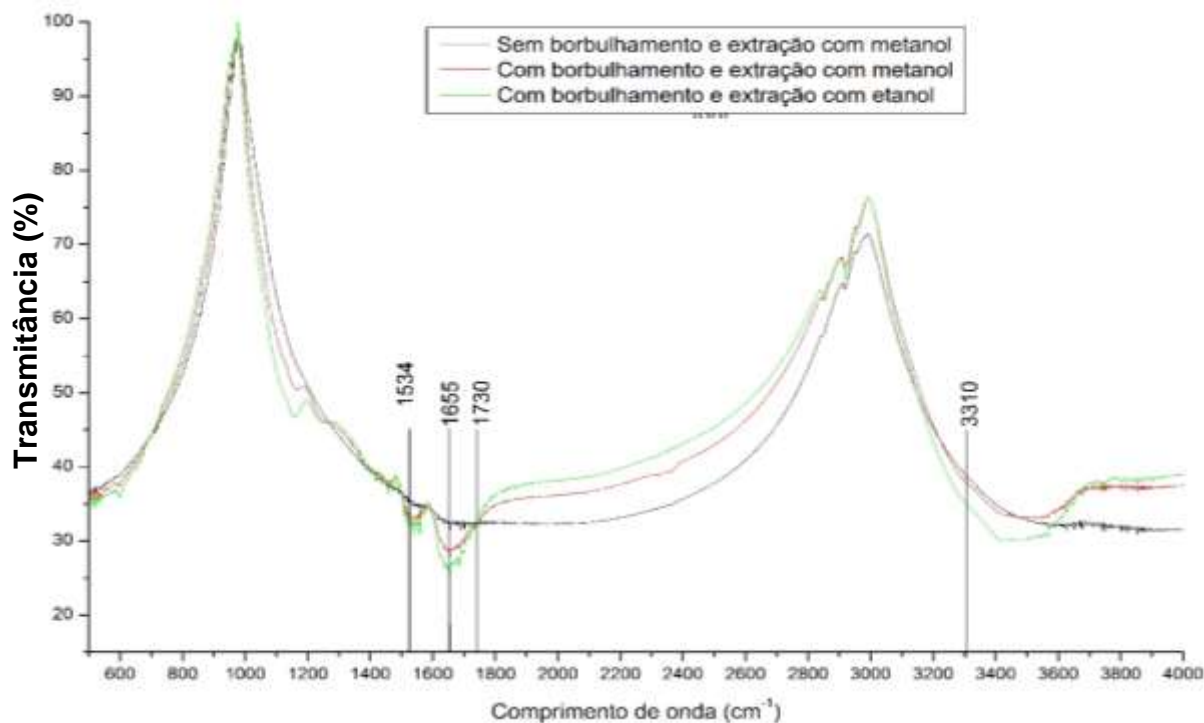


Figura 14 - Espectro obtido pelo FTIR com curvas sobrepostas referente aos tratamentos descritos.

Analisando a Tabela 6 e as Figuras 13 e 14, observa-se que:

- Os picos sob os comprimentos de onda 1534 e 1655 (grupos CO e CN) foram evidenciados nos casos em que houve borbulhamento e melhor observados para a purificação com etanol;

- O pico sob o comprimento de onda de 1730 (grupo Carbonil éster) não pôde ser observado como o apresentado pelo padrão de surfactina na Figura 13, mas apresenta-se na forma de um “ombro” menor, mas parecido com o observado pelo biosurfactante obtido no trabalho de Soares (2014) apresentado também na Figura 13. Mas neste trabalho só foi observado nos casos em que houve o borbulhamento, sendo no espectro da purificação com etanol ficou mais evidente;

- O pico sob o comprimento de onda de 3310 (grupo NH) (Figura 14) não apresentou a formação típica visualizada na Figura 13 em nenhum dos casos, contudo o espectro para a purificação com etanol mostra uma alteração na curva neste comprimento de onda.

Diante da análise acima realizada, pode-se dizer que há indícios de que o biosurfactante obtido pode ser a surfactina, contudo são necessária mais análises para se afirmar a veracidade deste fato, visto que pode haver a presença de interferentes como compostos aromáticos que também apresentam absorbâncias próximos a faixa de 3000 cm^{-1} , por exemplo, monossacarídeos residuais que foram arrastados nas etapas de borbulhamento e purificação ou ainda a existência de outros metabólitos possivelmente formados.

5.8. Aplicação e análise comparativa do produto produzido com um produto sintético

A atividade emulsificante foi obtida através da comparação das fases aquosa, oleosa e emulsionada de uma mistura realizada em vortex por 2 minutos com os produtos formados nos tratamentos abaixo descritos

- E1: emulsão sem biosurfactante;
- E2: emulsão com biosurfactante obtido sem borbulhamento e purificado com metanol;

- E3: emulsão formada com biosurfactante obtido com borbulhamento e purificado com metanol;
- E4: emulsão formada com biosurfactante obtido com borbulhamento e purificação com etanol;
- Lecitina: emulsão formada com lecitina com grau de pureza 85%.

As Figuras 15 e 16 apresentam resultados visuais das emulsões formadas.

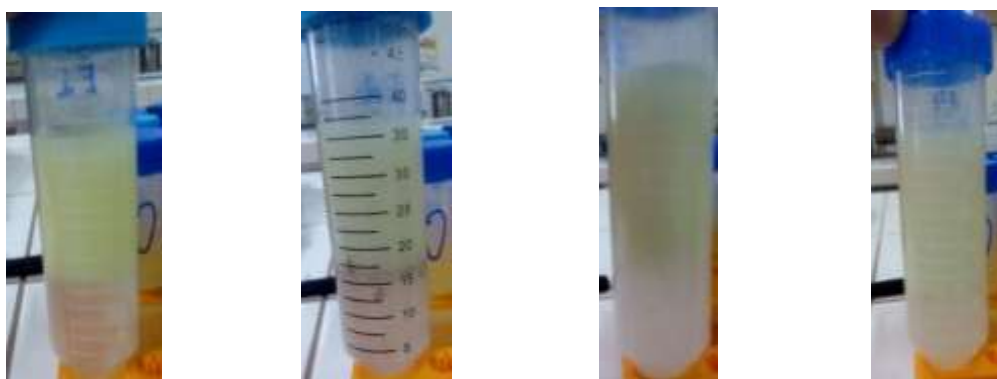


Figura 15 - Tubos contendo as emulsões formadas com os produtos após a emulsificação (tempo zero), da esquerda para a direita: E1, E2, E3 e E4.

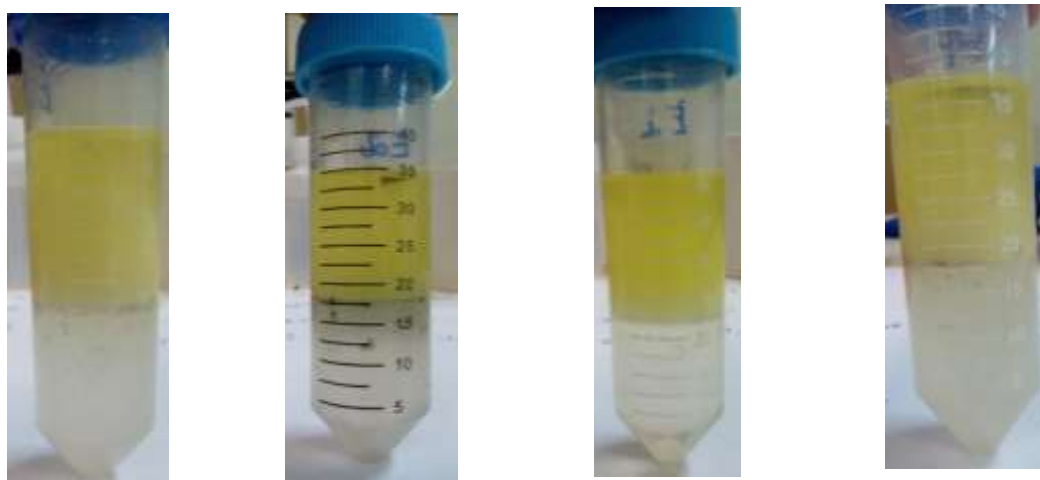


Figura 16 - Tubos contendo as emulsões formadas com os produtos após 3 dias, sendo da esquerda para a direita: E1, E2, E3 e E4.

O volume das fases foi determinado no decorrer de três dias, os resultados são apresentados na Tabela 7 e nas Figuras de 17 a 19.

Tabela 7 - Análise da fase óleo, emulsionada e água, seguindo a identificação descrita no item 5.5 transformada em porcentagem de volume total para uma melhor análise.

IDENTIFICAÇÃO	FASE ÓLEO			FASE EMULSIONADA			FASE ÁGUA		
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 1	DIA 2	DIA 3
E1	0	14,5	18	21,5	5	2	16	17,5	17
E2	0	12,5	13	18	5	4	18	18,5	17
E3	1	7,5	9	18	12,5	10	19	19	19
E4	1	12	14	19	8	6	19	17	17
LECITINA	13	14	16	24	14	8	3	12	16

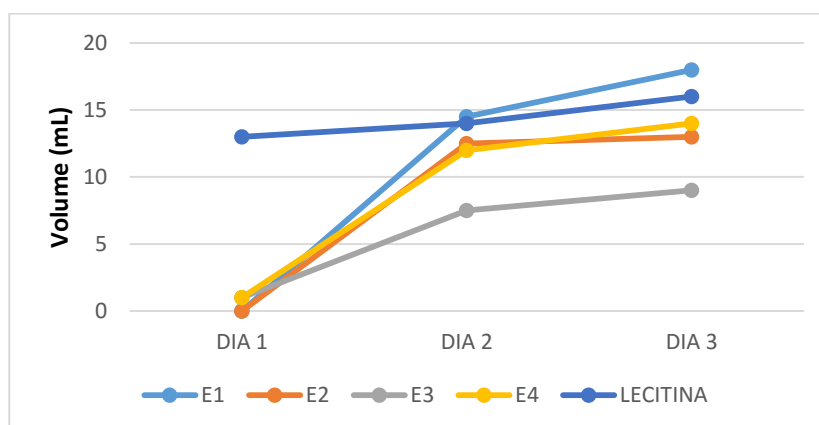


Figura 17 - Análise comparativa quanto ao volume da fase óleo (mL) ao longo do tempo (em dia).

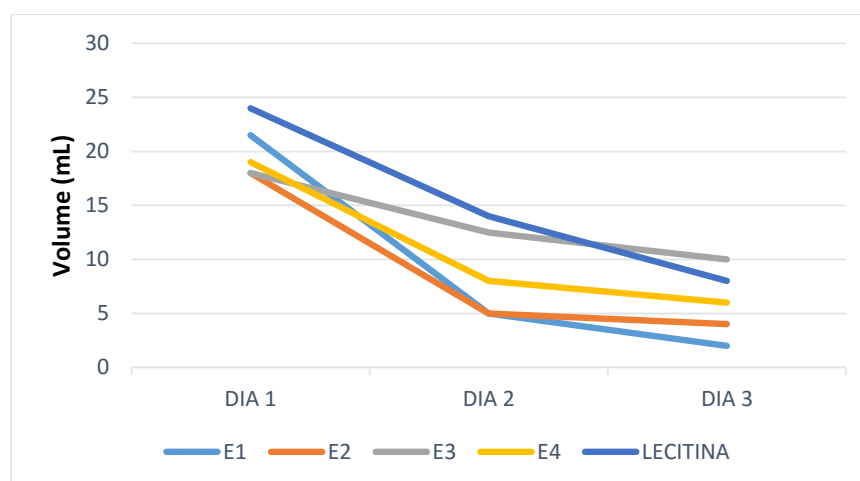


Figura 18 - Análise comparativa quanto ao volume da fase emulsionada (mL) ao longo do tempo (em dia).

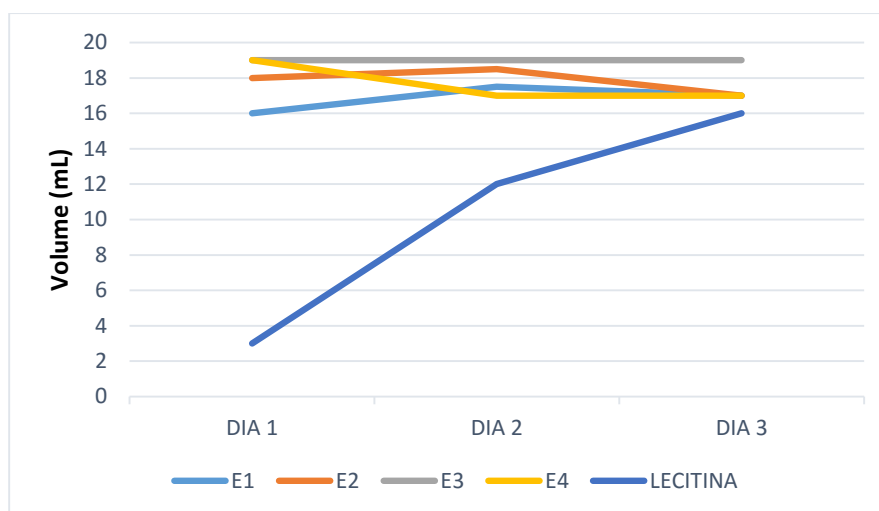


Figura 19 - Análise comparativa quanto ao volume da fase água (mL) ao longo do tempo (em dia).

Com a análise da Figura 18 pode-se observar que o borbulhamento fez com que aumentasse a concentração do biosurfactante, anteriormente evidenciado pelo FTIR e agora pelo aumento da fase emulsionada, e a purificação com metanol fez com que a molécula obtida formasse uma emulsão mais estável quando comparada à formada pela purificação com etanol, que demonstrou um decaimento superior, comparado ao metanol, quanto ao volume emulsionado, evidenciando um composto formado com menor estabilidade.

Outro aspecto que vale salientar é o poder emulsificante observado no caso E3, que ultrapassou o volume emulsionado da lecitina no terceiro dia. Com isso demonstrando que o poder emulsificante é superior a ela, podendo, assim, substituí-la, porém necessitando analisar tal composto em outros aspectos, como a toxicidade e a estabilidade após um período de tempo superior.

Ao observar a redução das fases oleosas (Figura 17) e aquosa (Figura 19) pode-se observar uma maior afinidade do composto utilizado em E3 com a fase oleosa, indicando uma molécula mais apolar devido a tal afinidade, podendo ser ligada à purificação por ela estabelecida junto ao borbulhamento. Já o composto em E4 demonstrou maior afinidade com a fase oleosa, contudo a emulsão formada foi em proporção superior à aquosa, sendo 45% de fase oleosa para 55% de fase aquosa, quando comparado aos outros compostos.

A estabilidade da emulsão ao longo do tempo, foi verificada com o auxílio de um microscópio óptico na lente 10x, a fim de observar a modificação ou constância das fases, conforme apresentado nas Tabelas 8,9 e 10.

Tabela 8 - Análise microscópica sob lente 10X das fases dos tubos E1, E2, E3 e E4 (descritos anteriormente) no dia 1.




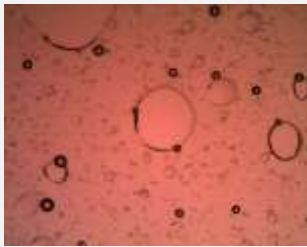








DIA 1			
	FASE ÓLEO	FASE EMULSIONADA	FASE ÁGUA
E1			
E2			
E3			
E4			

Tabela 9 - Análise microscópica sob lente 10X das fases dos tubos E1, E2, E3 e E4 (descritos anteriormente) no dia 2.














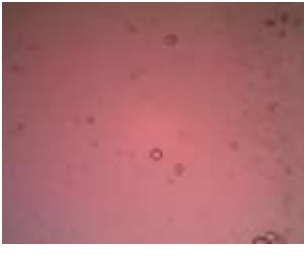





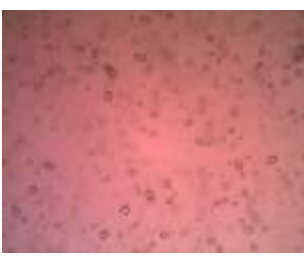




DIA 2			
	FASE ÓLEO	FASE EMULSIONADA	FASE ÁGUA
E1			
E2			
E3			
E4			

Tabela 10 - Análise microscópica sob lente 10X das fases dos tubos E1, E2, E3 e E4 (descritos anteriormente) no dia 3.

DIA 3			
	FASE ÓLEO	FASE EMULSIONADA	FASE ÁGUA
E1			
E2			
E3			
E4			

Observando a fase emulsionada, nas Tabelas de 8 a 10 pode-se notar que a purificação com metanol formou um biosurfactante que apresentou um

comportamento mais contínuo, com a emulsão mais consistente e com glóbulos regulares no decorrer dos dias observados. Pode-se observar também que o composto borbulhado e purificado com metanol demonstrou uma homogeneidade superior ao não borbulhado, indicando uma redução de interferentes no produto final e, posteriormente, uma emulsão mais regular.

Tal análise complementou a obtida pelo FTIR, onde o composto produzido é um biosurfactante, evidenciado pela sua atividade emulsificante, comprovado pela avaliação microscópica, sendo esta característica típica de um composto anfifílico, segundo Nitske e Pastore (2012).

6. CONCLUSÃO

Ao finalizar as atividades e analisar os resultados obtidos pode-se sugerir que há viabilidade técnica para um aumento de escala, empregando os parâmetros de processo utilizados neste trabalho, bem como, o processo de recuperação por borbulhamento.

Foi possível comprovar a possibilidade de produzir biosurfactante a partir de resíduos industriais, como o melaço de cana, objetivando diminuir o custo de produção deste produto.

Durante o pré-tratamento foi possível observar que o melaço foi clarificado e suplementado de modo que não houve perdas muito expressivas em termos de açúcares redutores. Contudo a esterilização do meio afetou diretamente na quantidade inicial de açúcares, podendo-se sugerir que talvez um processo de esterilização no modo contínuo possa minimizar esse problema.

O processo em biorreator de bancada demonstrou eficiência na reação, onde houve uma queda na quantidade disponível de açúcares redutores e uma elevação nas concentrações de produto e biomassa formados e acompanhados ao longo do processo. Vale salientar também que o borbulhamento fez com que a concentração do produto fosse elevada com o aumento de número de etapas de borbulhamento, deixando o produto com um grau de pureza superior.

A variação no processo de purificação mostrou que o metanol forma uma emulsão mais estável e um produto com bandas no FTIR menores quando comparado ao obtido pelo etanol, pelo qual houve a formação de um produto de baixa estabilidade emulsificante, porém com picos obtidos pelo FTIR mais evidentes quanto a caracterização do biosurfactante.

As análises das emulsões demonstraram que o biosurfactante produzido forma uma emulsão mais firme e de maior volume, de modo a superar o de uso comum, que é a lecitina, demonstrando que o biosurfactante poderia substituí-la.

7. SUGESTÕES

Este trabalho possibilitou a produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 9372 utilizando o melaço de cana suplementado com extrato de levedura e peptona como substrato obtendo produtos variando o tipo de recuperação e purificação a fim de caracteriza-los e identificar aquele com maior poder emulsificante e estabilidade de uma emulsão simples usando água e óleo de soja. Para afirmar a particularidade deste biosurfactante, recomenda-se a continuação deste estudo, em particular:

- Otimizar o pré-tratamento do melaço para um de menor custo produtivo;
- Refazer o experimento e evidenciar a real formação do biosurfactante;
- Utilizar outros substratos, com pré-tratamentos mais simples;
- Otimizar a recuperação e purificação do produto;
- Aplicar o biosurfactante produzido em produtos processados na área de alimentos;
- Melhorar a caracterização do biosurfactante com outras técnicas analíticas;
- Comparação dos métodos utilizando extrato de levedura e peptona;
- Utilizar água de maceração de milho, de modo a substituir a água destilada e combinar diferentes resíduos industriais;
- Utilizar levedura hidrolisada como fonte de nitrogênio, de modo a reduzir custos;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. **Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5**. 21p. Appl Biochem Biotechnol: Cairo, 2008.

ACIOLY, L.M.L. **Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* UCP 0999 em substratos não convencionais e de baixo custo**. Tese de mestrado em processos ambientais – Universidade Católica de Pernambuco: Recife, 2009.

ALMEIDA, Teresa C. A. **Avaliação da estabilidade de emulsões concentradas em bebidas**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

ALVES, A. P. C. **concentração em coluna de bolhas e espuma de surfactina obtida a partir de *Bacillus sp* itp – 001 isolado de solo contaminado por petróleo**. Tese (Mestrado em Engenharia de Processos) – Programa de pós-graduação em engenharia de processos, Universidade de Tiradentes: Aracaju, 2013.

BANAT, I. M. **Les biosurfactantes, plus que jamais sollicités**. 4 p. Irlande du Nord, BIOFUR 198, 2000.

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, 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.

BARROS, F. C.V.; QUADROS, C. P. de; Júnior, M. R. M.; PASTORE, G. M. **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos**. 6p. Química Nova: CAMPINAS, 2007.

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.

BEZERRA, M. S., Levantamento e Avaliação de Critérios para a Ampliação de **Escala da Produção de Biosurfactante utilizando melaço 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 biosurfactante 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.

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,

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. **Ciência de espuma – aplicação na extinção de incêndios**, *Química Nova*, 22 (1), p 126-130. 1999.

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.

GOMES, M. Z. V.; NITSCHKE, M. **Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria**. *Food Control*, São Paulo, São Carlos, v.25, p. 441-447, 2012.

GRIFFITHS, P. C.; CHEUNG, A. Y. F. **Interaction between surfactants and gelatin in aqueous solutions**, *Materials Science and Technology*, v. 18, p. 591-599, 2002.

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

INSTITUTO ADOLF 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.

INSTITUTO EUVALDO LODI; SEBRAE. **O novo ciclo da cana: estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos**. Instituto Euvaldo Lodi: Brasília, 2005.

JUNIOR, G. A.de L. **Obtenção de surfactina pelo microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. Tese (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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

KROG, N. **Theoretical Aspects of Surfactants in Relation to Their use in Breadmaking**. *Cereal Chemistry*: Brabrand, 1980.

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

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G.B.; FERREIRA, N. A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. EMBRAPA. Brasília, 2013.

MARIM, Marília G. **Obtenção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC (9372) a partir de melão de cana-de-açúcar**. Trabalho de conclusão de curso – Engenharia de Alimentos, UTFPR, Campo Mourão, 2014.

MARTI, M. E.; COLONNA, W. J.; REZNIK, G., PYNN, M.; JARRELL, K.; LAMSAL, B.; GLATZ, C. E. **Production of fatty-acyl-glutamate biosurfactante by *Bacillus subtilis* on soybean co-products**. 8p. *Biochemical Engineering Journal*: Ames, 2015.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes 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.

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

OLIVEIRA, R. F. **Obtenção de ácido láctico por fermentação de melaço de cana-de-açúcar e amido hidrolisado e suplementado.** Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2009.

PACHECO, G. J. **Produção de Biosurfactantes 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.

PARREIRA, A. G. **Produção de Biosurfactantes 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.

PAULIN, B. **Balanco populacional ao estudo da desemulsificação de petróleo e água em separador gravitacional.** Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2. ed. Volume 2. São Paulo: Makron, c1996-1997.

PENNA, T. C. V. et al. **Avaliação da Produção de biosurfactantes 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 Biosurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 146 p. 2007

RUST, D.; WILDES S. **Surfactants: a Market opportunity study update**. Omni Tech International LTD. 43 p. 2008.

SALAGER, J.-L. **SURFACTANTS Types and Uses**. 50 p. Universidad de Los Andes, Merida, FIRP, 2002.

SILVA, Neusely da; JUNQUEIRA, Valéria Christina Amstalden; SILVEIRA, Neliane Ferraz de Arruda. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 295 p. Varela: São Paulo, 1997.

SKOOG, D. A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH S.R. et al. **Fundamentos da química analítica**. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SOARES, D. W. F. **Produção e caracterização de biosurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* Isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará – Brasil)**. Tese de doutorado – Universidade Federal do Ceará e Universidad de Granada, Ceará, Fortaleza, 2014.

SOBRINHO, H. B. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biosurfactante por *Candida sphaerica***. 98 f. Dissertação

(Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SOTO, M. L.; MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. **Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review**, *Journal of Food Engineering*, 105, p. 1-27, 2011.

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.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. D. **Pré-tratamentos de melão de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a Bioprodução de carotenoides**. 1860 p. Volume 8. Química Nova: Erechim, 2007

VALPUESTA, R. R. F. **Otimização da Produção de Biosurfactantes 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.

VENDARAMAN, N.; VENKATESH, N. **Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTC 2423 from waste frying oils**. *Brazilian Journal of chemical Engineering: Chemai*, 2011.

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 out.2015

ANEXO 1: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE AR.