



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

DARLANE WELLEN FREITAS DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus subtilis* LAMI005
UTILIZANDO SUCO DE CAJU CLARIFICADO**

**FORTALEZA – CE
2010**



DARLANE WELLEN FREITAS DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus subtilis* LAMI005
UTILIZANDO SUCO DE CAJU CLARIFICADO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana Rocha Barros Gonçalves

**FORTALEZA – CE
2010**

O46p Oliveira, Darlane Wellen Freitas de
Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005
utilizando suco de caju clarificado / Darlane Wellen Freitas de Oliveira,
2010.
103 f. ; il. color. enc.

Orientadora Profª. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2010.

1. Agentes ativos de superfícies 2. *Bacillus subtilis* 3. Suco de caju
I. Gonçalves, Luciana Rocha Barros (orient.) II. Universidade Federal do
Ceará – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química IV. Título

CDD 660

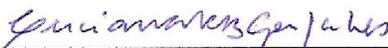
DARLANE WELLEN FREITAS DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus subtilis* LAMI005 UTILIZANDO
SUCO DE CAJU CLARIFICADO

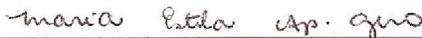
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química,
da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química.

Aprovada em 28 de junho de 2010.

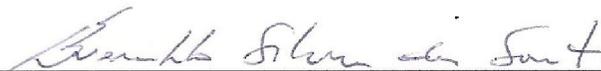
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof.^a Dra. Maria Estela Aparecida Giro
Faculdade Ateneu - FATE



Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

À Deus por tudo o que tenho e sou, aos meus pais Joaquim e Dalva, aos meus irmãos Darlan e Dayanne, ao meu marido Carlos e ao meu filho Carlos Diogo, pessoas que sempre estiveram ao meu lado, pelo apoio admiração e amor incondicionais que foram imprescindíveis em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer pela realização de mais esta conquista tão importante na minha vida.

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por guiar e iluminar meus passos.

Ao meu pai, Joaquim, pessoa que eu amo muito, pelo amor e admiração, por ter sido um pai companheiro, super protetor, rígido, mas sempre divertido e presente, acompanhando e participando do meu crescimento, desde bebê até a fase adulta.

À minha mãe Dalva, minha eterna companheira, pela educação, amor e confiança que foram imprescindíveis para o meu crescimento pessoal e profissional, por estar sempre presente em todos os momentos, na alegria e na tristeza, me dando força e me ajudando incondicionalmente, por tudo o que fez e ainda faz por mim, além de ser a segunda mãe do meu filho, Carlos Diogo.

Aos meus irmãos Dayanne e Darlan, essenciais na minha vida, pelo amor que nos une, por nossos dias de guerra e de paz, pela confiança, admiração e torcida fiel.

À minha cunhada Gleylce, por sempre receber meu filho muito bem em sua casa e por ter quebrado o galho como babá quando precisei.

Ao meu marido Carlos Soares, por seu amor e por suportar a minha ausência e correria durante esses dois anos, superando nossos problemas e dificuldades, me apoiando e não desistindo de mim.

Ao meu filho Carlos Diogo, o amor mais verdadeiro que eu tenho, por ser a pedra mais preciosa na minha vida, razão da minha alegria de viver, em fim, ele é tudo para mim. Fonte de inspiração e de renovação de forças para lutar e vencer.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Luciana Gonçalves, primeira porta que bati quando cheguei ao DEQ e que me foi aberta durante todo o mestrado. Agradeço pelo voto de confiança, por ter crescido tanto durante esses dois anos, como pessoa e como profissional, por tudo que me ensinou e por ser uma pessoa tão especial. Meu carinho, admiração e gratidão.

À Prof^a. Dra. Estela Giro, que me ajudou intelectualmente, emocionalmente e até como parceira em muitos experimentos. Uma pessoa muito especial que entrou na minha vida e que não vou esquecer.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química - DEQ/UFC, Prof. Dr. Hosiberto Santa'Ana, Prof. Dr. Célio Loureiro, Prof. Dr. Fabiano Fernandes e ao Prof. Dr. Gustavo Saavedra, pelos conhecimentos adquiridos no curso de mestrado. Em especial à Prof^a. Dra. Andrea Ferreira, por sua paciência e simpatia, pelos conselhos e pela ajuda quando precisei.

Aos meus amigos do GPBio: Jocélia, Jéssica, Marcinha, Bete, Valderez, Cleiton, Álvaro e Diego pelos momentos de descontração e companheirismo. Mary, por sempre me ajudar quando eu precisava. À Kamilly e Cristiane pela amizade e compreensão. À Juliana Rabelo pelo afeto que cultivamos em tão pouco

tempo. Agradeço em especial à Jouciane, por tudo que fez por mim, por sua presença e ajuda em todos os momentos, um presente que ganhei e espero não perder. À Tigressa, por ser sempre gentil e prestativa, tanto nas disciplinas, onde sua ajuda foi fundamental, como em minhas dúvidas no laboratório, que sempre atendeu prontamente. Aos meus companheiros de pesquisa, Ítalo, Jeferson e Danielle pela ajuda e parceria. Ao amigo de curso, Diogo, que sempre me ajudou em muitas decisões e me fez companhia em muitos momentos.

À Gabriela, amiga e comadre, pelo companheirismo, conselhos e por sua presença. À Alaídes, amiga de graduação, por nossa amizade ter continuado mesmo após a conclusão do curso.

Aos amigos que não fazem parte da vida acadêmica: Deusinete, uma fonte de força em um momento muito difícil, Amélia e Goretti. À Maria de Jesus, Kalina, Conceição e Amália, pela grande ajuda nos momentos que precisei. À Sofia por sua amizade e pelos momentos de descontração. Ao Sandro Nascimento, por me dizer o que eu precisava ouvir em muitos momentos difíceis e também nos momentos felizes.

Aos funcionários do DEQ/UFC, em especial à secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Maria Nogueira, por atender prontamente às nossas solicitações.

À Universidade Federal do Ceará e Departamento de Engenharia Química, por possibilitar a realização desse trabalho e obtenção do título de mestre.

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa fomentada.

*"Com amor inquebrantável e propósito definido toda dificuldade se vence e todo obstáculo se transpõe."
(Orison S. Marden)*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 em produzir biossurfactantes utilizando suco de caju clarificado como fonte de carbono. A capacidade de produção do microrganismo foi avaliada com um ensaio preliminar utilizando meio mineral como meio e cultivo, tendo glicose e frutose padrão analítico como fonte de carbono. Posteriormente avaliou-se a influência da variação nas concentrações da fonte de carbono, utilizando suco de caju clarificado como substrato, mantendo a concentração da suplementação da fonte de nitrogênio constante com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Realizou-se estudo cinético para avaliação da viabilidade de bioconversão do substrato utilizado em um produto de valor agregado, a surfactina bem como o tipo de metabólito formado. O ensaio com meio mineral, com concentrações iniciais de ART de $40,87 \text{ g.L}^{-1}$ a maior concentração de biomassa e surfactina obtidas foram de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ 137 mg.L^{-1} respectivamente, com 72 horas de ensaio. A menor redução da tensão superficial do meio rico em surfactina foi em torno de $27,0 \text{ dina.cm}^{-1}$, representando 55% de redução. O pH permaneceu numa faixa de 6,0 - 7,0. Variando a fonte de carbono tendo concentrações iniciais de ART de $12,71 \text{ g.L}^{-1}$, $22,92 \text{ g.L}^{-1}$, $48,96 \text{ g.L}^{-1}$, $65,04 \text{ g.L}^{-1}$, $96,10 \text{ g.L}^{-1}$ e $40,65 \text{ g.L}^{-1} + 0,1\%$ de solução de micronutrientes, a maior produção de surfactina obtida foi no ensaio com concentração de ART de $22,92 \text{ g.L}^{-1}$ atingindo o valor de $372,56 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas. A maior concentração de biomassa alcançada para os ensaios com variação nas concentrações iniciais de ART foram de $2,05 \text{ g.L}^{-1}$, $5,3 \text{ g.L}^{-1}$, $7,49 \text{ g.L}^{-1}$, $8,6 \text{ g.L}^{-1}$, $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,14 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente, para as concentrações de ART supracitadas. Todos os ensaios apresentaram carbono residual ao final do processo, pH chegando a valores muito ácidos de até 4,0, mostrando-se estável na faixa entre 6,0 e 7,0 apenas no ensaio com concentração de ART $96,10 \text{ g.L}^{-1}$. O surfactante produzido apresentou boa capacidade emulsificante, em torno de 50%, em hidrocarbonetos como querosene e óleo de soja e formaram emulsões estáveis, atingindo valores em torno de 2,0 U. Os ensaios fermentativos variando a concentração da fonte carbono apresentaram velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$) semelhantes. As velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de biossurfactante (μ_p) correlacionaram-se muito bem, podendo então afirmar que a formação do produto é um metabólito primário e está associada ao crescimento. O modelo matemático aplicado aos ensaios fermentativos ajustou-se bem aos dados experimentais, comprovando a viabilidade da bioconversão do substrato em um produto de valor agregado, a surfactina.

Palavras chave: Suco de caju clarificado, *Bacillus subtilis*, biossurfactantes.

ABSTRACT

The purpose of this study was evaluate the biosurfactants potential production of the microorganism *Bacillus subtilis* LAMI005 using clarified cashew apple juice as carbon source. The microorganism production capacity was evaluated with preliminary test using mineral medium as inoculum and cultivation, and glucose and fructose standard analytical as carbon source. Subsequently, the influence of carbon source variation was evaluated keeping the supplementation of nitrogen source constant at $1.0 \text{ g.L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Kinetic study was conducted to assess the feasibility of substrate bioconversion used in a value-added product, surfactin, and the type of formed metabolite. The test with mineral medium with initial concentrations of 40.87 g.L^{-1} TRS were obtained the higher biomass concentration and surfactin of 2.5 g.L^{-1} and 137 mg.L^{-1} respectively in 72 hours of testing. The lower surface tension reduction of the medium rich in surfactin was around $27.0 \text{ dyne.cm}^{-1}$, representing 55% reduction. The pH remained in a range from 6.0 to 7.0. By varying the carbon source and initial concentrations of TRS 12.71 g.L^{-1} , 22.92 g.L^{-1} , 48.96 g.L^{-1} , 65.04 g.L^{-1} , 96.10 g.L^{-1} and $40.65 \text{ g.L}^{-1} + 0.1\%$ solution of micronutrients, the highest yield was obtained in surfatin test concentration of TRS of 22.92 g.L^{-1} reaching a value of 372.56 g.L^{-1} in 48 hours. The highest concentration of biomass obtained for assays with variation in initial concentrations of TRS were 2.05 g.L^{-1} , 5.3 g.L^{-1} , 7.49 g.L^{-1} , 8.6 g.L^{-1} , 8.4 g.L^{-1} and 7.14 g.L^{-1} respectively, for concentrations above TRS. All tests showed residual carbon at the end of the process, reaching pH values much acid to 4.0, being stable in the range between 6.0 and 7.0 only at test concentrations of 96.10 g.L^{-1} TRS. Surfactant produced showed good emulsifying capacity, around 50% in hydrocarbons such as kerosene and soybean oil and formed stable emulsions, reaching values around 2.0 U. Fermentations varying the concentration of carbon source showed maximum specific growth ($\mu_{\text{máx}}$) similar. The specific growth rates (μ_{x}), substrate consumption (μ_{s}) and biosurfactant production (μ_{p}) fitted quite well, we conclude that the product formation is a primary metabolite and is associated with growth. The mathematical model used for testing fermentative fitted well to the experimental data, proving the feasibility of bioconversion of the substrate in surfactin.

Keywords: Clarified cashew apple juice, *Bacillus subtilis*, biosurfactant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da molécula de surfactina.....	21
Figura 2	Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração do surfactante (CMC: concentração micelar crítica).....	22
Figura 3	Estruturas básicas formadas por biossurfactantes.....	25
Figura 4	Processo de esporulação de <i>Bacillus sp.</i>	27
Figura 5	Colônias da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 em meio APGE.....	35
Figura 6	Esquema ilustrativo do processo de propagação do inóculo.....	36
Figura 7	Esquema ilustrativo do processo fermentativo para produção de biossurfactante.....	40
Figura 8	Extração líquido-líquido do biossurfactante.....	41
Figura 9	Cromatograma da curva de calibração para determinação da concentração de açúcares. Coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm) e pré-coluna (5 cm x 4,6 mm); 0,1 % de H ₃ PO ₄ em H ₂ O (MiliQ) como fase móvel na vazão de 0,5 mL.min ⁻¹	42
Figura 10	Determinação da concentração de surfactina.....	45
Figura 11	Perfil do crescimento celular, consumo de substrato e produção de surfactina em função do tempo para <i>B. Subtilis</i> LAMI005 em meio mineral com concentrações iniciais de ART de 40,87 g.L ⁻¹ . (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) surfactina, (▼) pH.....	49
Figura 12	Redução da tensão superficial em função do tempo para o ensaio com concentração inicial de ART de 40,87 g.L ⁻¹ realizado em <i>shaker</i> a 180 rpm, 30°C por 72 horas.....	51
Figura 13	Atividade emulsificante (U) da surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 das amostras de 48 e 72 horas de ensaio utilizando querosene como agente emulsificante.....	53
Figura 14	Perfil do crescimento celular (A), conversão do substrato (B) e produção de surfactina (C) em função do tempo para ensaios realizados em <i>shaker</i> utilizando <i>Bacillus Subtilis</i> LAMI005 cultivado em meio contendo suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART ± 40 g.L ⁻¹ utilizando os meios de cultivo A, B, C, D e E.....	55

Figura 15	Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para <i>Bacillus Subtilis</i> LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) e concentrações iniciais de ART de 48,96 g.L ⁻¹ + sulfato de amônio (1,0 g.L ⁻¹). (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.....	58
Figura 16	Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para <i>Bacillus Subtilis</i> LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 40,65 g.L ⁻¹ + 1,0 g. L ⁻¹ + 0,1% de solução de micronutrientes. (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.....	59
Figura 17	Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para <i>Bacillus Subtilis</i> LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 12,71 g.L ⁻¹ . (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.....	62
Figura 18	Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para <i>Bacillus Subtilis</i> LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 22,92 g.L ⁻¹ . (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.....	64
Figura 19	Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para <i>Bacillus Subtilis</i> LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 65,04 g.L ⁻¹ . (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.....	65
Figura 20	Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para <i>Bacillus Subtilis</i> LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 96,10 g.L ⁻¹ (suco não diluído). (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.....	65

Figura 21	Ajuste representativo para determinação da fase exponencial de crescimento dos ensaios fermentativos durante um período de 72 horas, utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) em <i>shaker</i> a 30°C, 180 rpm, variando concentrações iniciais de ART. (1) 12,71 g.L ⁻¹ , (2) 22,92 g.L ⁻¹ , (3) 48,96 g.L ⁻¹ , (4) 65,04 g.L ⁻¹ e (5) 96,10 g.L ⁻¹	70
Figura 22	Gráficos representativos para identificação do tipo de metabólito produzido nos ensaios fermentativos realizados por 72 horas, utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) em <i>shaker</i> a 30°C, 180 rpm, variando concentrações iniciais de ART. (1) 12,71 g.L ⁻¹ , (2) 22,92 g.L ⁻¹ , (3) 48,96 g.L ⁻¹ , (4) 65,04 g.L ⁻¹ e (5) 96,10 g.L ⁻¹ ; (—) μ_x , (—) μ_s , (—) μ_p	72
Figura 23	Representação gráfica dos dados experimentais e dos dados calculados de concentração de biomassa, produção de biossurfactante e consumo do substrato em função tempo para o ensaio fermentativo com concentração inicial de ART de 65, 04 g.L ⁻¹ . (■) X _{exp} , (—) X _{calc} ; (●) S _{exp} , (—) S _{calc} ; (◆) P _{exp} , (—) P _{calc}	74
Figura 24	Capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 em querosene e óleo de soja.....	77
Figura 25	Atividade emulsificante (U) da surfactina produzida por <i>B. subtilis</i> LAMI005 em diferentes concentrações de ART em ensaios realizados em <i>shaker</i> a 30 °C e 180 rpm: (1) 12,71 g.L ⁻¹ , (2) 22,92 g.L ⁻¹ , (3) 48,96 g.L ⁻¹ , (4) 65,04 g.L ⁻¹ , (5) 96,10 g.L ⁻¹ e (6) 40,65 g.L ⁻¹ + 0,1% de Solução de Micronutrientes.....	78
Figura 26	Concentração Micelar Crítica (CMC) da surfactina produzida por <i>B. subtilis</i> LAMI005 em diferentes concentrações de ART em ensaios realizados em <i>shaker</i> a 30 °C e 180 rpm: (A) 12,71 g.L ⁻¹ , (B) 22,92 g.L ⁻¹ , (C) 48,96 g.L ⁻¹ , (D) 40,65 g.L ⁻¹ + 0,1% de Solução de Micronutrientes, (E) 65,04 g.L ⁻¹ , e (F) 96,10 g.L ⁻¹	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Potenciais aplicações de biossurfactantes.....	24
Tabela 2	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.....	26
Tabela 3	Dados estatísticos da safra brasileira de castanha de caju para outubro de 2009.....	32
Tabela 4	Composição do meio mineral (MM).....	37
Tabela 5	Composição da solução concentrada de micronutrientes.....	37
Tabela 6	Composição dos meios de cultivo utilizados para os ensaios A, B, C, D e E realizados em <i>shaker</i> a 30°C e 180 rpm, por 30 horas utilizando <i>B. subtilis</i> LAMI005 com concentração de ART em torno de 40 g.L ⁻¹ .	38
Tabela 7	Índice de Emulsificação(%) da surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 das amostras dos tempos de 48 e 72 horas em ensaio com concentração inicial de ART de 40,87 g.L ⁻¹ realizado em <i>shaker</i> a 180 rpm, 30°C por 72 horas.....	52
Tabela 8	Resultados da Tensão Superficial (TS) para ensaios realizados em <i>shaker</i> a 30°C e 180 rpm, utilizando <i>B. subtilis</i> LAMI005 com diferentes meios de cultivo e concentração de ART em torno de 40 g.L ⁻¹ .	56
Tabela 9	Custo dos reagentes utilizados na preparação dos meios de cultivo.....	61
Tabela 10	Concentração de produto final, biomassa final, substrato inicial e final no tempo de maior produção de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 utilizando suco de caju clarificado como meio de cultivo em diferentes concentrações de ART a 30°C, 180 rpm, por 72 horas.	67
Tabela11	Fase exponencial de crescimento dos ensaios fermentativos durante um período de 72 horas, utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) em <i>shaker</i> a 30°C, 180 rpm, variando concentrações iniciais de ART.	69
Tabela12	Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo proposto por Mercier <i>et al.</i> (1992) aos dados experimentais por regressão não-linear a partir do método dos mínimos quadrados utilizando um software comercial (Solver - Microsoft Excel 2007).....	73

Tabela13	Índice de emulsificação(%) em diferentes concentrações de glicose utilizando o microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005, em ensaios realizado em <i>shaker</i> a 30°C e 180 rpm.	76
Tabela14	Resultados da Tensão Superficial (TS) para ensaios realizados em <i>shaker</i> a 30°C e 180 rpm, utilizando <i>B. subtilis</i> LAMI005 com diferentes concentrações de ART, onde: Ensaio (1): ART 12,71 g.L ⁻¹ ; Ensaio (2): ART 22,92 g.L ⁻¹ ; Ensaio (3): ART 48,96 g.L ⁻¹ ; Ensaio (4): ART 40,65 g.L ⁻¹ + micronutrientes; Ensaio (5): ART 65,04 g.L ⁻¹ ; Ensaio (6): ART 96,10 g.L ⁻¹ ; MC: meio de cultura antes do inóculo (branco); TS: Tensão Superficial.....	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	Surfactantes ou tensoativos.....	21
2.2	Biossurfactantes.....	23
2.2.1	Propriedades e aplicações.....	23
2.2.2	Microrganismos do gênero <i>Bacillus sp.</i> produtores de biossurfactantes.....	27
2.2.3	Produção de biossurfactantes.....	28
2.2.3.1	Surfactina.....	29
2.3	Aspectos econômicos.....	30
2.4	A cajucultura no Brasil.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Matéria-Prima.....	34
3.2	Preparação do Suco de Caju Clarificado.....	34
3.3	Microrganismos e Meio de manutenção.....	35
3.4	Propagação do inóculo <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e meios de cultivo.....	36
3.5	Avaliação da capacidade de Produção de Biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005.....	37
3.6	Avaliação da produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e consumo de ART em diferentes meios de cultivo.....	38
3.7	Avaliação da Produção de Biossurfactantes em mesa agitadora por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e os efeitos das concentrações de fonte de carbono.....	39
3.8	Extração do Biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> LAMI005.....	40
3.8.1	Extração líquido-líquido.....	40
3.9	Métodos Analíticos.....	41
3.9.1	Determinação da Concentração de Biomassa.....	41
3.9.2	Determinação da Concentração de Substrato.....	42
3.10	Avaliação da produção de biossurfactantes.....	43
3.10.1	Tensão Superficial.....	43
3.10.2	Índice de Emulsificação.....	43
3.10.3	Atividade Emulsificante.....	44
3.10.4	Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	44

3.11	Determinação da concentração de surfactina.....	45
3.12	Estimativa das velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto.....	45
3.13	Determinação da fase exponencial de crescimento.....	46
3.14	Modelagem dos dados experimentais de produção de biomassa, produção de surfactina e consumo de substrato.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
4.1	Avaliação da produção de biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 em meio mineral.....	49
4.1.1	Avaliação do crescimento microbiano, consumo de substrato, produção de surfactina e pH.....	49
4.1.2	Tensão Superficial.....	51
4.1.3	Índice de emulsificação e atividade emulsificante.....	52
4.2	Avaliação da produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 e consumo de ART em diferentes meios de cultivo.....	54
4.2.1	Avaliação do crescimento microbiano, conversão do substrato e produção de surfactina.....	57
4.3	Influência da suplementação do meio de cultivo (CAJC + (NH ₄) ₂ SO ₄) com solução de micronutrientes.....	56
4.4	Estudo da produção de biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 utilizando suco de caju clarificado (CAJC) suplementado com sulfato de amônia: Avaliação do crescimento celular, consumo de substrato, produção de biossurfactante e pH.....	62
4.5	Estudo cinético da produção de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005.....	69
4.5.1	Determinação da fase exponencial de crescimento.....	69
4.5.2	Identificação do tipo de metabólito produzido nos ensaios fermentativos.....	71
4.6	Modelagem matemática dos dados experimentais de produção de biomassa, produção de surfactina e consumo de substrato.....	73
4.7	Caracterização do Biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005 em suco de caju clarificado.....	75
4.7.1	Índice de Emulsificação e Atividade Emulsificante.....	75
4.7.2	Tensão Superficial.....	79
4.8	Concentração Micelar Crítica (CMC).....	81

5	CONCLUSÕES.....	85
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
	ANEXO A.....	99
	ANEXO B.....	100
	ANEXO C.....	101
	ANEXO D.....	102

1 – INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção polar e outra apolar. A porção polar ou hidrofílica, solúvel em água, pode ser iônica, não iônica ou anfotérica, ou seja, exibir características aniônicas ou catiônicas dependendo das condições de pH da solução aquosa na qual estão inseridos. A porção apolar ou hidrofóbica é geralmente um hidrocarboneto, insolúvel em água, porém solúvel em lipídios (Desai e Banat, 1997). Constituem uma classe importante de compostos químicos muito utilizados em diversos setores industriais, tendo como características importantes a fácil biodegradabilidade, baixa toxicidade e conseqüentemente fácil aceitabilidade ecológica por atuarem como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos, apresentando baixa solubilidade em água, capacidade de atuar em condições drásticas de temperatura ou pH (Desai e Banat, 1997, Cooper *et al.*, 1981; Mulligan, 2005; Yeh *et al.*, 2006). Os biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, e apresentam grande diferença em relação aos surfactantes sintéticos pela variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica (Shafi e Khanna, 1995). São produzidos por biotransformação de matérias-primas renováveis, apresentando a vantagem de baixos impactos ambientais em relação aos detergentes químicos convencionais (Banat *et al.*, 2000). O potencial de aplicação dos biossurfactantes, produzidos a partir de microrganismos, é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em diversos campos da agricultura, construção, indústrias alimentícias, de bebidas, petróleo, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (Bognolo, 1999; Fiechter, 1992; Mulligan *et al.*, 2001). O interesse em se utilizar surfactantes obtidos como subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras, os biossurfactantes, é crescente devido às vantagens que estes compostos apresentam em relação aos seus similares quimicamente sintetizados, e também pelo fato de sua ampla gama de aplicações (Dubey e Juwarkar, 2001; Makkar e Cameotra, 2002). Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídios produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (Desai e Banat, 1997).

Os surfactantes têm a capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais e de promover a formação de microemulsões, onde água pode solubilizar hidrocarbonetos

(Fernandes *et al.*, 2008) além de encontrarem papel fundamental na estabilidade de emulsões, ou seja, a redução da tensão interfacial associada com a formação de uma emulsão (Shahidzadeh *et al.*, 2000), de tal forma que os surfactantes agem para facilitar a emulsificação através da formação de um filme adsorvido em torno das gotas dispersas, o que impede a floculação e a coalescência (Lima, 2004). O processo de emulsificação é acompanhado por um aumento da área interfacial, o que produz uma elevação brusca da energia livre de superfície (Becher, 1965). Em geral a formulação de emulsões disponíveis comercialmente é produzida à base de óleos minerais. No entanto, com a crescente fiscalização e exigências ambientais, utilização de fontes renováveis a base de óleos vegetais torna-se uma fonte alternativa no atual contexto mundial. Diversos são os óleos vegetais de importância econômica e tecnológica que podem ser utilizados na formulação de emulsões. Pode-se somar a isso a utilização de surfactantes de origem microbiológica, os biossurfactantes, na composição desse sistema contribuindo com a biodegradabilidade destas emulsões.

Entretanto, apesar de todas as características apresentadas pelos surfactantes naturais, o mesmo ainda não é economicamente competitivo, devido ao alto custo de sua produção associada com a utilização de substratos caros e métodos ineficientes de recuperação do produto (Fox e Bala, 2000). A utilização de biossurfactantes ainda é limitada devido à competição com os surfactantes de origem sintética, especialmente quando se considera a capacidade para atender às necessidades da aplicação pretendida, a funcionalidade e ao custo. Altos custos de produção são incompatíveis com as aplicações industriais, que requerem grandes quantidades de surfactantes. Nesse sentido, para o desenvolvimento de biossurfactantes, é fundamental a redução de custos de produção, onde o uso de matérias-primas de baixo custo, como resíduos agroindustriais, pode ser uma solução para esta questão econômica (Makkar e Cameotra, 2002a; Mercade e Manresa, 1994; Mukherjee *et al.*, 2006). A produção de biossurfactantes pode ser induzida por hidrocarbonetos ou substratos insolúveis em água, porém, os biossurfactantes também podem ser produzidos a partir de substratos solúveis em água, especialmente carboidratos (Karanth *et al.*, 1999; Mulligan, 2005).

A produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais tornou-se tema de muitas pesquisas, tendo em vista que as substâncias biodegradáveis são compatíveis com o meio ambiente e a utilização de substratos alternativos, ricos em carboidratos ou lipídios para crescimento do microrganismo e biossíntese dos biossurfactantes, reduzem os custos de

fabricação, obtendo-se assim produtos economicamente viáveis. Dentro deste contexto, e ainda, dentro do âmbito regional, mais especificamente da agroindústria do estado do Ceará, o suco de caju é um potencial substrato a ser estudado, uma vez que é uma matéria-prima rica em carboidratos, fibras, vitaminas e sais minerais de grande abundância na região Nordeste (Rocha *et al.*, 2006).

No Brasil estima-se que a área ocupada com cajueiro corresponde a aproximadamente 783.000 ha, sendo que a região Nordeste responde com mais de 90% da área colhida e da produção nacional, sendo os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte responsáveis por cerca de 85% da área cultivada no país de acordo com dados divulgados pelo IBGE para safra de castanha de caju de 2009. Calcula-se que seja utilizado apenas de 15% a 20% da polpa na fabricação de doces, sucos, vinho ou consumo *in natura* e que 80% seja desperdiçado, ou seja, milhares de toneladas de pedúnculo são jogados fora. Ainda há perda de grande parte do pseudofruto no campo, no momento do descastanhamento feito para a indústria de beneficiamento da castanha, a qual o pseudofruto não interessa. (Garruti *et al.*, 2003).

Sabe-se que o suco de caju, fonte de carbono utilizada como fonte de carbono no presente estudo, é uma rica fonte de carboidratos, tendo glicose e frutose (açúcares redutores totais – ART) como principais fontes de carbono, que serão utilizadas pelo microrganismo além de diversos aminoácidos, proteínas e sais minerais como ferro (Wei e Shu, 1998; Wei *et al.*, 2004) e manganês (Wei e Shu, 2002) que são considerados importantes para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. Vale ressaltar que a matéria prima utilizada também possui outros nutrientes que poderão ser consumidos pelo microrganismo podendo ser citados o magnésio, as proteínas solúveis e os aminoácidos como metionina, cisteína e histidina.

Diante dos expostos, este projeto objetivou avaliar o potencial de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando como substrato, suco de caju clarificado, tendo em vista que este substrato não convencional é uma fonte de nutrientes abundante e renovável que atualmente é desperdiçada. Os ensaios foram realizados em diversas condições de cultivo, a fim de avaliar a melhor condição para obtenção de uma maior quantidade e qualidade do produto final. Realizou-se ainda a quantificação da bioconversão do suco de caju clarificado em um produto de valor agregado, a surfactina.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Surfactantes ou tensoativos

Os surfactantes são definidos como moléculas anfipáticas, ou seja, constituídos de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, que em função da presença destes grupos, tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade: óleo/água e água/óleo (Figura 1). São também chamados de tensoativos, por reduzirem a tensão superficial e interfacial de líquidos. Possuem a capacidade de formar microemulsões com os hidrocarbonetos, proporcionando uma grande diversidade de aplicações industriais (Palejwala & Desai, 1989).

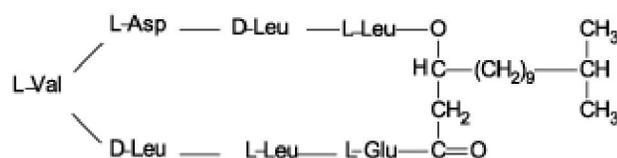


Figura 1 – Estrutura química da molécula de surfactina. Fonte: Nitschke e Pastore , 2002.

A Figura 1 mostra a estrutura química de uma molécula de surfactina, onde pode ser visualizada uma cadeia apolar, capaz de interagir com o óleo e uma extremidade polar, capaz de interagir com a água. Estes compostos constituem uma importante classe de produtos químicos largamente utilizados na indústria moderna, com aplicação na indústria farmacêutica, cosmética, petroquímica, tintas, produtos de limpeza, agricultura entre outros (Duarte *et al.*, 2003; Banat *et al.*, 2000).

Outra característica desses compostos é a capacidade de formar agregados micelares a partir de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC). Quando a concentração do surfactante aumenta no meio aquoso, a tensão superficial, que é a força de atração que existe entre as moléculas dos líquidos, diminui, ocorrendo a formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna. A Concentração Micelar Crítica (CMC) é formada pela concentração dessas micelas, que corresponde à concentração mínima de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, formam-se várias micelas (Mulligan,

2005; Piróllo, 2006; Rufino, 2006). Um bom surfactante deve diminuir a tensão superficial da água de 72 para 35 dina/cm e sua eficiência está relacionada a uma baixa CMC, concentração micelar crítica (Mulligan *et al.*, 2005), definida como a concentração mínima necessária para iniciar a formação de micelas (Becher, 1965).

Os surfactantes geralmente são utilizados em produtos comerciais com a finalidade de melhorar a dispersão ou a solubilização de materiais hidrofóbicos em água (Mulligan e Gibbs, 1993). Avalia-se a eficácia destes compostos em função das suas propriedades físicas descritas, como tipos de misturas que estabelecem com a água, como solubilidade, concentração micelar crítica (CMC), tensão superficial e tensão interfacial (Figura 2).

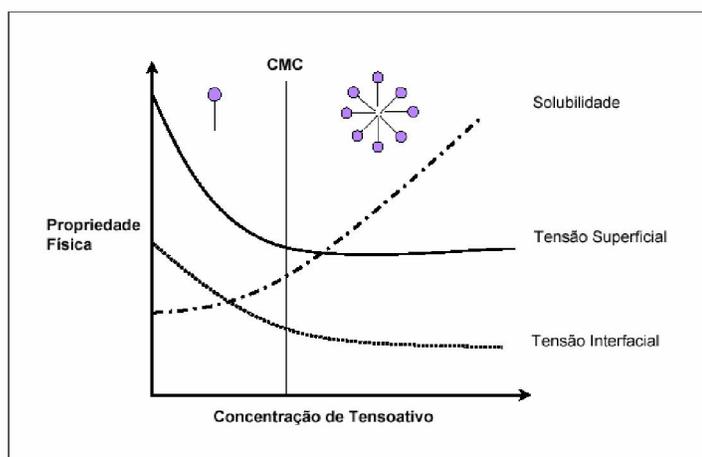


Figura 2 - Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade em função da concentração do surfactante (CMC: concentração micelar crítica). Fonte: Mulligan *et al.*, 2001.

A Figura 2 mostra a relação entre a concentração do emulsificante e as propriedades físicas descritas anteriormente. Em uma emulsão, onde existe um limite interfacial entre duas fases imiscíveis, os surfactantes concentram-se nas interfaces sólido-líquido, líquido-líquido ou vapor-líquido. A parte hidrofóbica da molécula concentra-se na superfície voltada à fase hidrofóbica, enquanto a porção hidrofílica está orientada para a solução (Mulligan, 2005). A tensão superficial, que é uma medida da energia livre da superfície por unidade área requerida para trazer uma molécula à superfície (Rosen, 1978), correlaciona-se com a concentração do composto ativo na superfície até que a CMC seja alcançada. A tensão interfacial é a superfície de separação entre duas substâncias quaisquer. Ao contrário da tensão superficial de um líquido, a tensão interfacial de um par de substâncias

pode ser negativa. Neste caso, a energia potencial de coesão diminui a medida que a área da interface aumenta, e este aumento se produz espontaneamente por ser a adesão entre as moléculas mais intensa do que a coesão entre elas (Souza, 1995).

Durante a década de 80, a demanda produtiva para surfactantes aumentou aproximadamente 300% na indústria química americana (Lang e Wulbrandt, 1999). Em 1997, o mercado mundial para surfactantes foi de aproximadamente US\$9,5 bilhões anuais (Desai e Banat, 1997). A importância econômica dos surfactantes sintéticos reflete-se pelo aumento do número de patentes e publicações como também pelo aumento do consumo destes compostos em escala mundial (Kim *et al.*, 2000). Entretanto, esses compostos químicos são prejudiciais ao meio ambiente, pois são tóxicos e não apresentam biodegradabilidade. A maioria dos surfactantes comercializados é derivada principalmente do petróleo. Entretanto, os rápidos avanços na biotecnologia e o aumento das preocupações com o meio ambiente, combinado a mudanças nas legislações (Banat *et al.*, 2000), têm aumentado o interesse em biossurfactantes de origem microbiana, por suas características principais como baixa toxicidade, aceitabilidade ambiental e a possibilidade de produção utilizando substratos renováveis (Makkar e Cameotra, 2002), além da tolerância à temperatura, pH e força iônica e de serem biodegradáveis no solo e na água (Lin, 1996).

2.2 – Biossurfactantes

2.2.1 – Propriedades e aplicações

Os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos e constituem um grupo diversificado de surfactantes que possuem aplicações variadas em setores industriais devido a sua versatilidade funcional (Ishigami e Suzuki, 1997). Surfactantes naturais são sintetizados por uma variedade de organismos vivos, tais como plantas (saponinas), animais (ácidos biliares) e microrganismos (glicolipídeos) (Bognolo, 1999). Apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tais como: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, elevada compatibilidade ambiental, biodigestibilidade e efetividade em condições extremas de temperatura, pH e força iônica (Cameotra e Makkar,

1998; Kosaric, 1992; Sousa, 2008). Estas características permitem a sua utilização na agricultura, na indústria de cosméticos, petrolífera, de lubrificantes, alimentícia, de produtos de limpeza entre outras. As aplicações dos biossurfactantes atualmente estão mais voltadas para a indústria petrolífera, na recuperação terciária de petróleo e biorremediação de hidrocarbonetos, havendo relatos a solubilização e emulsificação de compostos químicos tóxicos. A Tabela 1 mostra algumas funções e potenciais aplicações de biossurfactantes.

Tabela 1 - Potenciais aplicações de biossurfactantes.

Função	Aplicação
Dispersantes e emulsificantes	Cosméticos, tintas, aditivos para óleo
Solubilizantes e microemulsões	Produtos farmacêuticos
Agentes umectantes	Indústria têxtil, tintas e fármacos
Detergentes	Produtos agrícolas e domésticos
Agentes espumantes	Cosméticos e produtos para flotação
Agentes seqüestrantes de metais	Mineração
Demulsificantes	Tratamento de resíduos líquidos
Agentes redutores de viscosidade	Transporte de óleo cru através de tubulações
Recuperação Melhorada do Petróleo	Recuperação melhorada do petróleo

Fonte: Banat *et al.*, 2000.

Como propriedades funcionais podem ser destacadas a atividade emulsificante, molhabilidade, solubilização, demulsificação, inibição a corrosão, complexação de metais e redução da viscosidade de óleos pesados (Fiechter, 1992). Possuem uma ampla variedade de moléculas quimicamente diferentes como glicolipídios, lipossacarídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, lipopeptídios e alguns polímeros (Desai; Desai, 1993; Bognolo, 1999; Lang, 2002; Maier, 2003; Barros, 2008). Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídios produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (Bognolo, 1999). A surfactina é um dos mais poderosos biossurfactantes conhecidos e considerada como um CLPBS (*cyclic lipopeptide biosurfactants*) e possui diversas atividades biológicas como antibacteriana e antiviral e na estimulação da atividade dos macrófagos (Vollenbroich *et al.*, 1997).

Os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (Champion *et al.*, 1995). As estruturas básicas são mostradas na Figura 3.

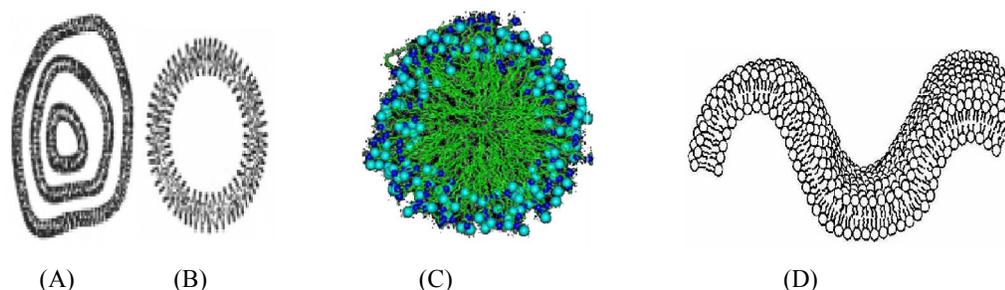


Figura 3 – Estruturas básicas formadas por biossurfactantes. (A) vesícula multilamelar; (B) vesícula unilamelar; (C) Micelas; (D) Lamela.

Fonte: (A, B, D) Colla & Costa, 2003; (C) Nitschke e Pastore, 2002.

Queiroga *et al.* (2003) utilizaram o microrganismo *Bacillus subtilis* para avaliação da tensão superficial na produção de biossurfactantes em presença de petróleo, observando uma redução de tensão superficial de 53 dina/cm para 25,7 dina/cm. Wey *et al.* (2003), identificaram que a adição de ferro em quantidade apropriada ao cultivo de *Bacillus subtilis* 21332 melhorou significativamente a produção de surfactina.

Há uma grande quantidade de microrganismos com a capacidade de degradar e/ou assimilar hidrocarbonetos. Desse número de microrganismos, alguns também são capazes de emulsificar esses hidrocarbonetos durante o processo da degradação do substrato. Microrganismos que assimilam petróleo ou derivados são comumente encontrados em locais onde ocorreu alguma contaminação, ou em áreas que historicamente têm sido expostas a algum tipo de hidrocarboneto (Sampaio, 1995). A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é produzida a partir de derivados de petróleo. Entretanto, é crescente o aumento da preocupação ambiental, o que leva à procura de biossurfactantes como alternativa aos produtos existentes. Além disso, outras propriedades destes biocompostos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e propriedades biológicas, os colocam como alternativas promissoras (Kosaric, 1992; Desai e Banat, 1997; Holmberg, 2001; Maier, 2003; Cameotra e Makkar, 2004; Barros *et al.*, 2007). Enquanto os surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes incluem: glicolípídeos, fosfolípídeos,

lipopeptídeos ou lipoproteínas (Desai e Desai, 1993). A Tabela 2 apresenta as principais classes de biossurfactantes e microrganismos responsáveis pela produção dos mesmos.

Tabela 2 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipo de biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios - ramnolipídios - soforolipídios - trehalolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> <i>T.apícola</i> <i>Rhodococcus erythropolis.</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas - Peptídio-lipídio - Viscosina - Serravetina - Subtilisina - Surfactina - Gramicidina - Polimixina	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus Brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios - Ácidos graxos - Lipídios neutros - Fosfolipídios	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos - Emulsão - Biodispersão - Liposan - Carboidrato-lipídio-proteína - Manana-lipídio-proteína	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados - Vesículas - Células	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Fonte: Desai e Banat, 1997.

2.2.2 – Microrganismos do gênero *Bacillus sp.* produtores de biossurfactantes

O gênero *Bacillus* é formado por um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas ou Gram-variáveis, aeróbicas, com formato de bastonete, que podem ocorrer isolados ou em cadeia, produtores de esporos resistentes a condições adversas, não apresentando mais de um esporo por célula (Holt *et al.*, 1994). Algumas espécies são patogênicas, como o *Bacillus anthracis*, mas a maioria delas é considerada própria do meio ambiente, participando inclusive de diversos ciclos biogeoquímicos (Encinas *et al.*, 1996). Esses microrganismos apresentam grande plasticidade fisiológica no que se refere às condições de temperatura, pH e salinidade dos ambientes nos quais são encontrados como água, solo, associadas às plantas, ambientes poluídos, sedimentos marinhos entre outros (Encinas *et al.*, 1996).

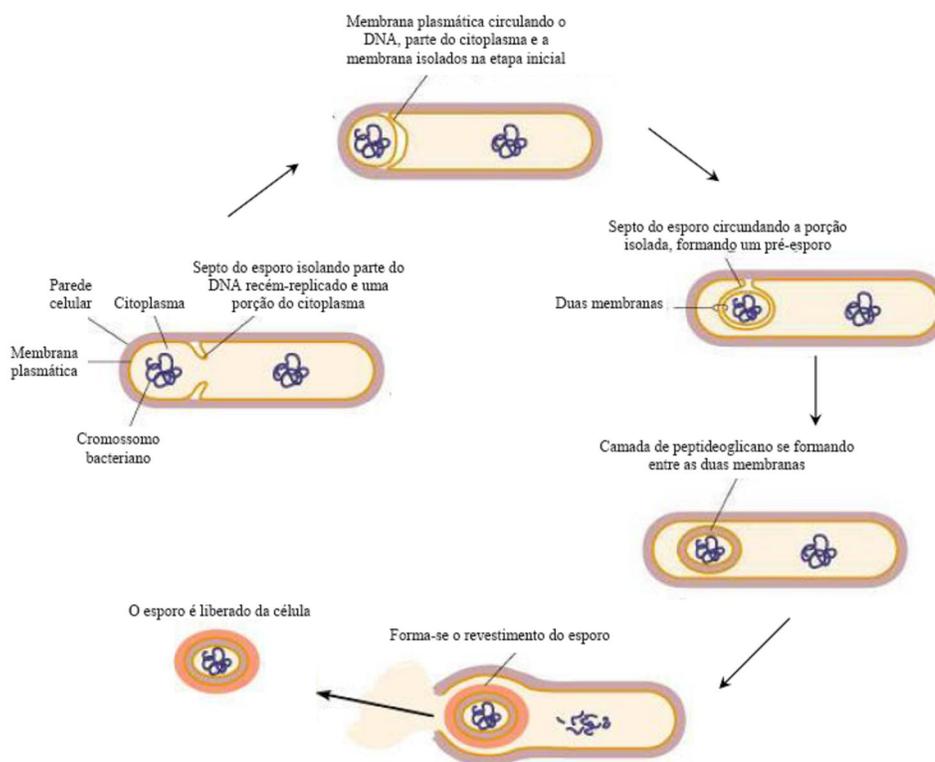


Figura 4 - Processo de esporulação de *Bacillus sp.* (Tortora *et al.*, 2005).

A Figura 4 mostra a seqüência do processo de esporulação do microrganismo *Bacillus sp.* Devido à grande resistência de seus esporos e da alta habilidade metabólica das células vegetativas, este gênero representa-se como um dos grupos de microrganismos mais

importantes comercialmente e, conseqüentemente, um dos mais estudados. As espécies do gênero *Bacillus* são atualmente reconhecidas como produtoras de antibióticos e outras drogas, inseticidas, biossurfactantes, compostos químicos e enzimas (Ivanova *et al.*, 1999). O gênero *Bacillus*, portanto, representa um grupo importante e bastante diversificado, com uma extraordinária ecologia de interesse em vários segmentos da biotecnologia (Eichler, 2001) e vem atraindo grande interesse dos mais diversos setores industriais por possuírem essa gama de características tão promissoras (Schallmeyer *et al.*, 2004).

Bacillus subtilis são microrganismos produtores de lipopeptídeos, como a surfactina, que contém sete aminoácidos ligados aos grupos carboxila e hidroxila do ácido 14 (Kakinuma *et al.*, 1969). Concentrações de surfactina menores que 0,005% reduzem a tensão superficial de 72 dina/cm para 27 dina/cm, tornando a surfactina um dos biossurfactantes mais poderosos. A solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, no entanto, vai depender do tipo de resíduo utilizado como substrato (Hue *et al.*, 2001). Queiroga *et al.* (2003), utilizaram *Bacillus subtilis* para avaliação da tensão superficial na produção de biossurfactantes em presença de petróleo, observaram uma redução da tensão superficial de 53 dina/cm para 25,7 dina/cm. Wey *et al.* (2003) identificaram que a adição de ferro em quantidade apropriada ao cultivo de *Bacillus subtilis* 21332 melhorou significativamente a produção de surfactina.

2.2.3 – Produção de biossurfactantes

A produção de moléculas com atividade de redução da tensão superficial ocorre quando os substratos fornecidos aos microrganismos são hidrocarbonetos, possibilitando aos microrganismos utilizarem estes compostos, normalmente insolúveis em meio aquoso, o que impede a sua oxidação e assimilação (Colla e Costa, 2003). As vias metabólicas dessas moléculas nos microrganismos envolvem primeiramente a formação das moléculas que irão constituir as porções hidrofóbicas e hidrofílicas do mesmo, envolvendo os mecanismos de biossíntese de ácidos graxos, carboidratos e derivados. A assimilação de n-alcenos pode ocorrer através de três mecanismos:

(a) assimilação de hidrocarbonetos dissolvidos no meio, geralmente cadeias carbônicas curtas, com menos de 10 carbonos, que apresentam solubilidade limitada em meio aquoso;

(b) mecanismo de contato direto, no qual ocorre a formação de agregados compostos de células, gotas de hidrocarbonetos e ar, ocasionando um aumento na lipoficidade da superfície celular induzida pelo contato com o hidrocarboneto, que é absorvido pela célula através das camadas lipofílicas do envelope celular; ou

(c) assimilação de hidrocarbonetos emulsificados, onde a partir do contato com a célula, o substrato é convertido em pequenas gotículas, ocasionando uma pseudo-solubilização através de agentes extracelulares produzidos pelas células (Kosaric & Cairns, 1987).

Cepas de *Bacillus* têm sido bastante utilizadas para a produção do biossurfactante denominado surfactina, o qual consiste de um lipopeptídio cíclico consistindo de um ácido graxo de 14 a 15 carbonos ligado a um peptídio com 7 resíduos de aminoácidos (Colla e Costa, 2003). A surfactina é produzida por diversas cepas de *Bacillus*, nos quais a fonte de carbono utilizada geralmente é um carboidrato e não um hidrocarboneto ou óleo vegetal. Kim *et al.* (1997) estudaram a produção de um biossurfactante denominado C9-BS utilizando *Bacillus subtilis* C9 tendo como fontes de carbono a glicose, óleo de soja ou n-hexadecano. Um elevado rendimento de produção do C9-BS foi obtido com glicose como fonte de carbono, enquanto a utilização de hidrocarbonetos como substrato inibiu a produção do biossurfactante. Giro *et al.* (2009) em estudos realizados com o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio mineral e utilizando suco de caju clarificado (CAJC) como fonte de carbono, com concentração de ART em torno de 40 g.L⁻¹, observaram que a glicose foi consumida preferencialmente pelo microrganismo e obtiveram consumo total tanto da glicose como da frutose ao final de 48 horas de ensaio, além de obterem concentrações de surfactina em torno de 125 mg.L⁻¹ com o mesmo tempo de cultivo.

2.2.3.1 – Surfactina

Entre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídios produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente os produzidos pelo *Bacillus subtilis*, a surfactina (Bognolo, 1999). Diversos fatores podem influenciar diretamente na estrutura e atividade dos biossurfactantes dentre os quais podem ser como a fonte de carbono, fonte nitrogênio, temperatura, pH, salinidade, entre outros (Fernandes, 2007). A fonte de carbono, particularmente o tipo de carboidrato, exerce grande efeito sobre o tipo de glicolipídio

produzido por *Bacillus subtilis* (Malkkar e Cameotra, 1997; Makkar e Cameotra, 1998). A surfactina produzida por *B. subtilis*, por exemplo, precipita em pH inferior a 5,0, o que impossibilita sua utilização em ambientes ácidos (Wei *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2004).

A adição de nutrientes aos meios de cultivo para produção de surfactina é de grande relevância para a obtenção de significativas concentrações do produto final. Sais de ferro são frequentemente mencionados na literatura quanto ao efeito significativo no rendimento de surfactina e de biomassa para *B. subtilis* (Cooper *et al.*, 1981). Altas concentrações de íon ferroso, como FeSO₄, promovem redução de biomassa, mas o rendimento do biossurfactante é relevante mesmo nessas condições (Makkar e Cameotra, 2002b), sendo 0,719 mmol.L⁻¹ a concentração ótima de FeSO₄ para a produção de surfactante por *B. subtilis* MTCC 2423. Há relatos para *B. subtilis* de aumento de dez vezes na produção de surfactina quando a concentração de ferro no meio foi aumentada para 4 µmol.L⁻¹, aumento maior que os atribuídos a cepas geneticamente modificadas (Wei *et al.*, 2004).

2.3 – Aspectos econômicos

A questão econômica é uma das principais preocupações dos processos biotecnológicos, especialmente quando o tema é a produção de biossurfactantes. A produção só despertará interesse se houver desenvolvimento de processos economicamente viáveis, onde pode ser incluso o uso de materiais renováveis e de baixo custo, que resultam numa redução de 10 a 30% do custo total da produção (Cameotra e Makkar, 1998). A literatura dispõe de estudos envolvendo a utilização de substratos alternativos, principalmente os solúveis em água, como melão, água de maceração de milho, soro de leite e etanol para a produção de biossurfactantes (Patel e Desai, 1997; Matsufuji *et al.*, 1997). Desta forma, fontes renováveis e resíduos agroindustriais têm sido largamente usados para a produção de biossurfactantes (Mercade *et al.*, 1993). A aplicabilidade desses substratos alternativos vêm crescendo, principalmente pelo fato da questão econômica ser um obstáculo freqüente em processos biotecnológicos, especialmente no caso da produção de biossurfactantes.

A seleção do substrato depende da escolha de um resíduo com um bom balanço de nutrientes para crescimento e produção. Os resíduos industriais com elevado teor carboidratos

ou lipídios encontrados são elementos necessários para o uso como substratos para produção de biossurfactantes (Makkar e Cameotra, 1999; Mercade e Manresa, 1994).

Barros *et al.* (2007) descreveram a importância da variedade de resíduos industriais como matéria-prima para diversos bioprocessos. Segundo os autores, a utilização de resíduos agroindustriais para produção de biossurfactantes é um dos passos para viabilizar e implantar esses processos em escala industrial, sendo necessário um balanço de nutrientes para desenvolver condições adequadas para o desenvolvimento e produção desses compostos. Os efluentes de processamento de batatas foram evidenciados como substitutos atrativos dos substratos convencionais, uma vez que são fonte de carboidratos na forma de amido e açúcar, de nitrogênio e de carbono, considerando que a composição do meio interfere na redução da tensão superficial.

Nitschke e Pastore (2006) utilizaram com sucesso resíduos industriais de fritura de batata na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. Anteriormente, Nitschke *et al.* (2004) selecionaram microrganismos para a produção de biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais. Utilizaram melão, soro de leite e manipueira obtendo valores de tensão superficial em torno de 26 mN/m. Rufino (2006) utilizou um resíduo de refinaria na produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* obtendo resultados satisfatórios em relação à redução de tensão superficial.

2.4 – A cajucultura no Brasil

O cajueiro, denominado *Anacardium occidentale* L. por Lineu, pertence ao gênero *Anacardium*, da família *Anacardiaceae*, é perene e apresenta crescimento contínuo, podendo atingir até 20m de altura. No Brasil, os maiores produtores estão localizados na região Nordeste: Ceará, Piauí, Rio Grande do Norte e Bahia. Sendo assim, a fruta é de grande importância econômica na região, uma vez que gera 35 mil empregos diretos no campo e 15 mil na indústria, além de 250 mil empregos indiretos nos dois segmentos. O Núcleo de Estudo em Fruticultura (NEFRUTE) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) destaca em seus estudos que o cajueiro ocupa lugar de destaque entre as plantas frutíferas tropicais, em face da crescente comercialização dos seus produtos principais, a amêndoa e o líquido contido no mesocarpo da castanha. O caju é na verdade um pseudofruto, uma vez que a castanha é que o

verdadeiro fruto, uma drupa, cuja semente é comestível. O que chamamos de fruto é na verdade o pedúnculo que se desenvolveu de modo diferente, cujas cores variam do amarelo ao vermelho.

A Tabela 3 fornece dados estatísticos da safra brasileira de castanha de caju tendo como referência o mês de outubro de 2009, em relação a 2008. Os dados apresentam uma variação de 17,14% na produção, 3,84% na área plantada, mais de 2,41% na área colhida (hectares) e 14,55% no rendimento (kg de castanha por hectare). As estimativas são feitas sempre em função da castanha de caju, o verdadeiro fruto, e de acordo com esses dados estimam-se os dados referentes ao pseudofruto, o pedúnculo do caju.

Tabela 3 – Dados estatísticos da safra brasileira de castanha de caju para outubro de 2009.

Área plantada, área colhida e produção (referência: outubro de 2009)				
Brasil e Estados	Safra	Área Plantada (ha)	Área Colhida (ha)	Produção (t)
Brasil	2008	753.590	741.036	239.702
	2009	782.493	758.924	280.786
Maranhão (4°)	2008	19.820	18.989	6.587
	2009	19.607	18.777	6.512
Piauí (2°)	2008	179.635	179.580	56.279
	2009	184.615	184.615	67.921
Ceará (1°)	2008	397.449	386.757	121.045
	2009	410.433	396.462	149.107
Rio Grande do Norte (3°)	2008	116.685	116.685	42.593
	2009	125.842	118.295	42.922
Paraíba (7°)	2008	8.150	8.102	3.238
	2009	8.112	8.058	3.215
Pernambuco (5°)	2008	7.536	6.897	5.633
	2009	8.118	7.260	5.827
Bahia (6°)	2008	24.315	24.026	4.327
	2009	25.766	25.457	5.282
Rendimento médio (Kg de castanha/ha) – Brasil – outubro de 2009				
Ano			Variação (%)	
2008		2009		
323		370	14,6	
Elaborado a partir do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA)				

Fonte: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistemático_da_Producao_Agricola_%5Bmensal%5D/Fasciculo/2009/lspa_200910.zip. Acessado em 12 de novembro de 2009.

Do caju tudo é aproveitado, o suco, o bagaço, castanha, a casca da árvore, folhas, flores e a madeira. Entretanto é amêndoa tostada do caju, o foco de grande interesse no mercado mundial, sendo a que desperta maior interesse econômico para as indústrias. A

amêndoa é responsável por cerca de 1/3 da castanha, a sua análise revela um teor de óleo de 55 a 60%, 15 a 20% de proteínas e em torno de 5% de açúcares (Medina *et al.*, 1980).

Estima-se que seja utilizado apenas de 15% a 20% da polpa na fabricação de doces, sucos, vinho ou consumo *in natura* e 80% seja desperdiçado, ou seja, milhares de toneladas de pedúnculo são jogados fora. Há também uma perda na colheita, onde boa parte deste pedúnculo já é descartada no próprio campo. Estudos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) mostram que cada quilo de castanha corresponde a 9 quilos de pedúnculo. De acordo com os dados estatísticos listados acima e os estudos da Embrapa, pode-se afirmar que o Brasil desperdiça mais de 1 milhão de toneladas de pedúnculo.

Aproveitar este resíduo industrial para a produção de um co-produto de alto valor agregado é um grande desafio, tendo em vista que devido a pequena escala de produção dos biossurfactantes, surfactantes biodegradáveis de origem microbiana, o mercado não demonstra interesse relevante. A busca por processos para otimização e aumento da escala de produção desses tensoativos vem crescendo nos últimos anos e já apresenta dados bastante satisfatórios, que levam a uma maior credibilidade da entrada dos biossurfactantes no mercado. Acontecimento que seria de grande valia econômica e por todas as suas características de compatibilidade ambiental.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Matéria-Prima

Foi avaliada a produção de biossurfactantes utilizando suco de caju clarificado como meio de cultivo, a partir de cajus (*Anacardium occidentale* L), variando as concentrações de fonte de carbono e mantendo a suplementação de fonte de nitrogênio. O suco de caju clarificado (CAJC) foi preparado na Embrapa Agroindústria Tropical.

3.2 – Preparação do Suco de Caju Clarificado

O caju foi processado na Embrapa Agroindústria Tropical na Universidade Federal do Ceará, de acordo com algumas etapas da metodologia de Melo *et al.*, 2000. Os frutos foram pré-selecionados, para retirar folhas e frutos estragados e outras sujeiras presentes e, em seguida, lavados em tanques com água clorada (10 ppm) e corrente (de preferência). Extraíu-se o suco em prensas do tipo expeller, um parafuso sem fim, forçando o suco para uma tela de aço inoxidável perfurada e com abertura de 0,5mm aproximadamente. Para o processo de clarificação o suco extraído foi colocado em um recipiente de aço inoxidável, onde foi adicionada solução de gelatina (10%), e foi agitado lentamente, até o suco flocular. Vale salientar que a dosagem da gelatina pode variar, de acordo com as características do caju (matéria-prima). Após a clarificação, o suco foi deixado em repouso por 15 minutos a meia hora, para sedimentar em um recipiente de aço inoxidável, separando-se a polpa por gravidade. Finalmente, filtrou-se o suco clarificado, para remoção da turbidez proveniente de precipitados, e o mesmo foi distribuído em bombonas plásticas de 5 litros para armazenagem e mantido a -10°C, sem adição de conservantes.

3.3 – Microrganismos e Meio de manutenção

Foi avaliado o potencial de produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005, previamente isolado de um tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (ETE-PICI). Esta linhagem pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e foi identificada pela seqüência de gene 16S rRNA, o qual está depositado no banco de genes com número de acesso FJ413046. A Figura 5 ilustra as colônias de bactérias *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio APGE.



Figura 5 - Colônias da bactéria *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio APGE

Para manutenção do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005, utilizou-se o meio APGE composto por: peptona 5,0 g.L⁻¹, glicose 5,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹ e ágar 15,0 g.L⁻¹. O meio APGE foi esterilizado a 121°C por 30 minutos, distribuído em placas de petri e tubos rosqueados estéreis em capela microbiológica e a seguir, incubado em estufa bacteriológica a 30°C por 24 horas. A cultura foi mantida sob refrigeração a 4°C e repicada a cada 60 dias.

3.4 – Propagação do inóculo *Bacillus subtilis* LAMI005 e meios de cultivo

Repicou-se o microrganismo em placas de petri contendo meio APGE em ágar para a preparação do inóculo *Bacillus subtilis* LAMI005 e em seguida incubado em estufa microbiológica a 30°C por 24 horas, conforme Figura 6. Após este período de incubação, tempo em que o microrganismo encontra-se na sua fase exponencial de crescimento, foram transferidas três alçadas da cultura de microrganismo para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio estéril de propagação do inóculo. Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório, *shaker* (Tecnal TE - 480) a 30°C, 180 rpm por 40 h. A densidade óptica do inóculo foi medida a 600nm em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys, utilizando como branco o meio de cultivo estéril. Para padronização do número de células iniciais utilizadas em cada experimento, ajustou-se a densidade óptica a uma faixa entre 0,10 – 0,20 através de diluições com o meio de cultivo.



Figura 6 – Esquema ilustrativo do processo de propagação do inóculo

O meio de cultura utilizado para a produção do inóculo do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005, foi primeiramente o meio mineral de Mórán *et al.* (2000), apresentado na Tabela 4, com modificações na concentração de NaCl de 27,0 g.L⁻¹ para 2,7 g.L⁻¹, contendo 10 g.L⁻¹ de glicose grau analítico, como fonte de carbono e adição de 0,1% de solução de micronutrientes (Tabela 5). O meio foi ajustado para pH 7,0 com NaOH (3M) ou HCl (3M) e esterilizado a 110°C por 10 minutos.

Tabela 4 – Composição do meio mineral (MM).

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	7,2
KH ₂ PO ₄	3,0
NaCl	2,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6

Fonte: Morán *et al.*, 2000.

Tabela 5 – Composição da solução concentrada de micronutrientes.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,95
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,00
MnSO ₄ .H ₂ O	1,54
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,39
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,25
NaB ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,17
EDTA	2,50

Fonte: Morán *et al.*, 2000.

O meio de cultivo utilizado para a produção do inóculo do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 para os ensaios com variação de fonte de carbono foi suco de caju clarificado com concentrações de ART de 22,92 g.L⁻¹ e adição de (NH₄)₂SO₄ na concentração de 1,0 g.L⁻¹ de como suplementação de fonte de nitrogênio.

3.5 – Avaliação da capacidade de Produção de Biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005.

Inicialmente, avaliou-se a capacidade de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando meio mineral (MM). O preparo do meio de cultivo foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL, contendo meio mineral, solução de micronutrientes (0,1%), glicose e frutose P.A nas concentrações de 20 e 17 g.L⁻¹, respectivamente. Em seguida,

adicionou-se (10% de inóculo) ao meio de cultivo, para o volume final de fermentação de 50 mL. Todos os meios foram ajustados a pH 7,0 com NaOH 3M e esterilizados a 110°C por 10 minutos. Este ensaio serviu como controle, de maneira a propiciar uma comparação com o meio de cultivo contendo suco de caju clarificado.

3.6 - Avaliação da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 e consumo de ART em diferentes meios de cultivo

Avaliou-se a influência da suplementação de diferentes composições de nutrientes no crescimento microbiano e na produção de biossurfactantes. Estes ensaios foram conduzidos em *shaker* rotatório por 30 horas, visando uma comparação entre os meios, denominados A, B, C, D e E, cuja composição é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição dos meios de cultivo utilizados para os ensaios A, B, C, D e E realizados em *shaker* a 30°C e 180 rpm, por 30 horas utilizando *B. subtilis* LAMI005 com concentração de ART em torno de 40 g.L⁻¹.

Ensaio	Composição	Concentração
A	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹
B	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ Solução de Micronutrientes	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 0,1%
C	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ NaCl	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 2,7 g.L ⁻¹
D	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 0,6 g.L ⁻¹
E	Suco de caju clarificado (NH ₄) ₂ SO ₄ Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O KH ₂ PO ₄	ART ± 40 g.L ⁻¹ 1,0 g.L ⁻¹ 7,2 g.L ⁻¹ 3,0 g.L ⁻¹

O inóculo utilizado nos ensaios A, B, C, D e E foi o mesmo citado no item 3.4 para os ensaios realizados utilizando suco de caju clarificado como substrato (suco de caju clarificado com concentrações de ART de 22,92 g.L⁻¹ e adição de 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ como suplementação de fonte de nitrogênio), sendo acrescentada solução de micronutrientes apenas ao inóculo do ensaio B.

3.7 – Avaliação da Produção de Biossurfactantes em mesa agitadora por *Bacillus subtilis* LAMI005 e os efeitos das concentrações de fonte de carbono

O preparo do meio de cultivo foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL, contendo suco de caju clarificado (CAJC) diluído com água destilada para se obter os açúcares redutores totais (ART) nas concentrações de: 12,71 g.L⁻¹, 22,92 g.L⁻¹, 40,65 g.L⁻¹ + 0,1% de solução de micronutrientes, 48,96 g.L⁻¹, 65,04 g.L⁻¹ e 96,10 g.L⁻¹ (suco não diluído). Adicionou-se ainda sulfato de amônio na concentração de 1,0 g.L⁻¹. Para a realização dos ensaios, adicionou-se (10% de inóculo) ao meio de cultivo, para um volume final de fermentação de 50 mL. O inóculo para propagação do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 para os ensaios com variação de fonte de carbono utilizando suco de caju clarificado foram preparados com concentrações de ART de 22,92 g.L⁻¹ e adição de 1,0 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ como suplementação de fonte de nitrogênio. Todos os meios foram ajustados para pH 7,0 com NaOH (3M) e/ou HCl (3M) e esterilizados a 110°C por 10 minutos. Os frascos foram colocados em mesa agitadora a 30°C e 180 rpm durante um período de 72 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata e as amostras foram retiradas no tempo de: zero, 8, 24, 48 e 72 horas. A cada intervalo de tempo, as amostras retiradas foram centrifugadas a 10000 g, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante livre de células, foi submetido às medidas de tensão superficial, índice de emulsificação, atividade emulsificante, pH, concentração de substrato (ART) e concentração de surfactina. O pH dos meios de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um potenciômetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP, em temperatura ambiente (24 – 27°C). A Figura 7 ilustra o procedimento utilizado para preparação e realização dos ensaios fermentativos.

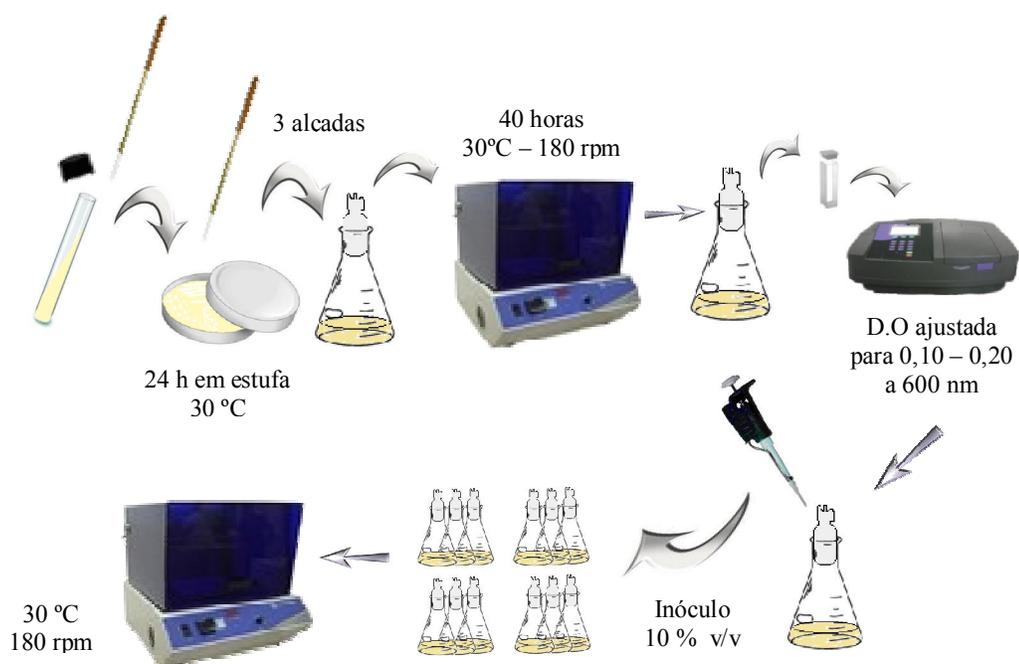


Figura 7 – Esquema ilustrativo do processo fermentativo para produção de biossurfactante.

3.8 – Extração do Biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005

3.8.1 – Extração líquido-líquido

Para a extração da surfactina, biossurfactante produzido por microrganismos do gênero *Bacillus*, o meio de cultivo contendo células foi centrifugado a 10000 g, a 04°C por 15 minutos para recolher o sobrenadante livre de células. Recolheu-se uma alíquota de 20 mL do sobrenadante e este foi ajustado para pH 2,0 com HCl 3M. A solução resultante permaneceu em repouso por aproximadamente 18 horas, a 4°C para que ocorresse a precipitação da surfactina. Após este tempo, o extrato rico em surfactina foi centrifugado a 10000 g, a 4°C por 15 minutos. O precipitado assim obtido, foi dissolvido em 8,0 mL de água deionizada pH 8,0 e posteriormente fez-se a extração líquido-líquido utilizando cloreto de metileno (1:1). A mistura foi agitada por 5 minutos e permaneceu em repouso por uma hora em funil de

separação para que ocorresse a separação das fases. A fase contendo o solvente e a surfactina foi recolhida em Becker após o tempo de espera. Esse procedimento foi repetido três vezes. O material recolhido no Becker permaneceu a temperatura ambiente para que houvesse a completa evaporação do solvente e restasse somente a surfactina. O produto obtido foi ressuspensionado em 2,0 mL de metanol para posterior análise. A Figura 8 ilustra o procedimento para extração da surfactina.

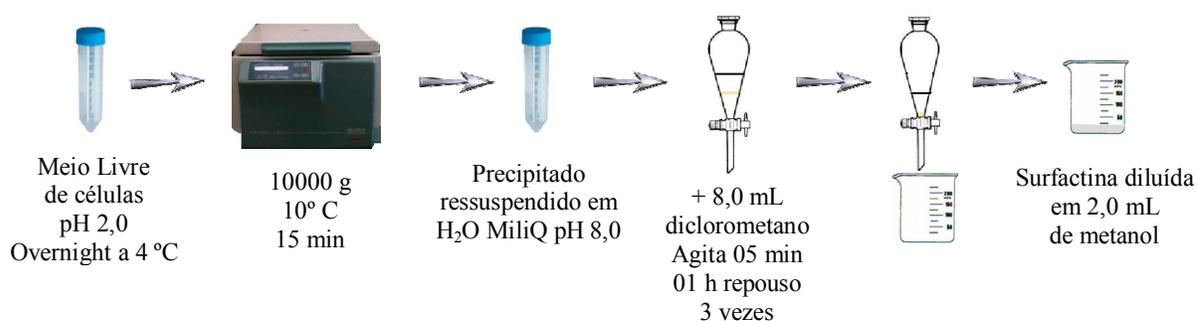


Figura 8 – Extração líquido-líquido do biossurfactante.

3.9 – Métodos Analíticos

3.9.1 – Determinação da Concentração de Biomassa

A concentração de biomassa foi realizada pela determinação da densidade óptica (D.O) a 600 nm, em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys. O método baseia-se na medida da turvação do meio em função da quantidade de células em suspensão, possuindo vantagens como rápida execução e utilização de equipamentos relativamente simples (Rocha, 2007). Determinou-se também a concentração de biomassa por peso seco obtido por filtração utilizando membrana (éster de celulose - Millipore) com diâmetro de poro de 0,45 µm, previamente pesada. Neste procedimento, filtrou-se uma amostra de 5 mL do meio fermentado sobre vácuo, lavou-se três vezes com o mesmo volume de água destilada para remover completamente qualquer resíduo dos componentes do meio, colocou-se em estufa a 60°C até que se obtivesse peso constante, segundo metodologia de Reis *et al.* (2004), com

modificações. A seguir, foram feitas diluições do meio de cultivo do qual se retirou o volume para obtenção de massa seca, para então se obter a curva de calibração da concentração de biomassa ou crescimento celular.

3.9.2 – Determinação da Concentração de Substrato

A concentração de glicose e frutose (açúcares redutores totais – ART) foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo Waters (Modelo 2414) acoplado a detector de índice de refração (célula a 40°C), coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm) e pré-coluna (5 cm x 4,6 mm) da Sigma Aldrich utilizando como fase móvel 0,1 % de H₃PO₄ em H₂O MiliQ, na vazão de 0,5 mL.min⁻¹. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL e o tempo de análise foi de 20 minutos em duplicata.

A Figura 9 mostra um cromatograma de uma curva de calibração de glicose e frutose P.A analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. Observou-se picos característicos da glicose e frutose, com um tempo de retenção de 12,9 e 14,1 minutos, respectivamente, nas condições estudadas.

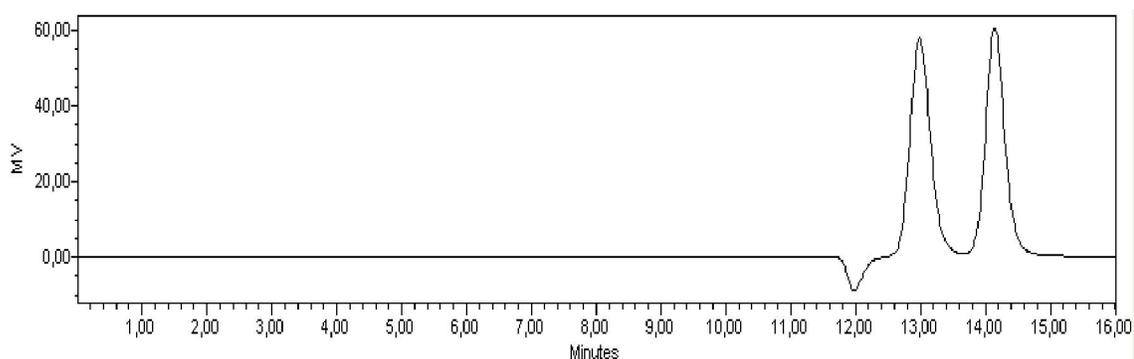


Figura 9 – Cromatograma da curva de calibração para determinação da concentração de açúcares. Coluna Supelcogel C610H (30 cm x 7,8 mm) e pré-coluna (5 cm x 4,6 mm); 0,1 % de H₃PO₄ em H₂O (MiliQ), como fase móvel na vazão de 0,5 mL.min⁻¹.

3.10 – Avaliação da produção de biossurfactantes

Foram realizadas análises de tensão superficial, índice de emulsificação e atividade emulsificante para acompanhar a produção de biossurfactantes.

3.10.1 – Tensão Superficial

Um dos métodos utilizados para avaliação da produção de biossurfactantes foi realizado medindo-se a tensão superficial do caldo livre de células, a 25°C, segundo o método de anel de Du Noüy, utilizando um tensiômetro Krüss, modelo K6 (Costa *et al.*, 2006). O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura. Utilizou-se 30 mL de sobrenadante livre de células para cada amostra analisada. As análises foram realizadas em triplicata. A redução da tensão superficial foi calculada utilizando a Equação 1:

$$\text{Redução da Tensão Superficial} = \frac{TS_{t=Bco} - TS_{t=ti}}{TS_{t=Bco}} * 100 \quad (1)$$

onde $TS_{t=Bco}$ é a tensão do meio utilizado como branco, onde não foi colocado inóculo e $TS_{t=ti}$ refere-se a amostra dos intervalos de tempo analisadas.

3.10.2 – Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado de acordo com Cooper e Goldenberg (1987) e Makkar e Cameotra (1997) com pequenas modificações: 2,0 mL do meio de cultura fermentado livre de células foram colocados em tubo de ensaio, com fundo chato e adicionou-se o mesmo volume de diferentes fontes hidrofóbicas como querosene, gasolina e óleo de soja. Agitou-se em vórtex por dois minutos, em alta rotação. O índice de emulsificação foi calculado através da razão entre a altura da região emulsificada e altura total após 24 horas, de

acordo com a Equação (2) proposta por Wei *et al.*, 2005. O teste do índice de emulsificação foi realizado em duplicata

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{TOTAL}} \times 100 \quad (2)$$

sendo H_{FE} a altura da fase emulsionada e H_{TOTAL} a altura total da solução.

3.10.3 – Atividade Emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada segundo Cirigliano e Carman (1985) com pequenas modificações: utilizou-se 0,5 mL de meio cultura fermentado livre de células, 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 3,6) e 0,25 mL de querosene. Agitou-se em vórtex por 2 minutos, em alta rotação. A emulsão resultante permaneceu em repouso por 10 minutos e, em seguida, a absorbância dessa emulsão foi medida em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys a 540 nm (A_{540}), a cada 10 minutos, até um tempo final de 50 minutos, para avaliar a estabilidade da emulsão. A análise foi conduzida em duplicata. Define-se uma unidade de atividade emulsificante como a quantidade de biossurfactante que mudou a absorbância da fase aquosa a 540nm (A_{540}) por 1,0 nas condições descritas anteriormente (Cirigliano e Carman, 1985).

3.10.4 – Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Determinou-se a concentração micelar crítica (CMC) através de diluições sucessivas do meio fermentado rico em surfactina, de acordo com metodologia descrita por Santa Anna *et al.* (2002a), das amostras em que foram detectadas maior quantidade de biossurfactantes após análise de quantificação do produto realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Mediu-se a tensão superficial em um tensiômetro (Krüss K6) a 30°C, de acordo com o método do anel de Du Noüy (Costa *et al.* 2006). As análises foram realizadas em triplicata.

3.11 – Determinação da concentração de surfactina

A concentração de surfactina foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), acoplado com detector UV (Waters, modelo 2487) e equipado com a coluna de fase reversa Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, Irlanda), utilizando fase móvel formulada com 20% de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80% de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ a temperatura ambiente. A surfactina foi detectada usando detector UV, modelo 2487 (Waters) a 205 nm. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL e o tempo de análise para cada amostra foi de 30 minutos, em duplicata. As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração com surfactina padrão 95% da Sigma-Aldrich (Wei *et al.* 2002; Yeh *et al.*, 2005). A Figura 10 ilustra o procedimento para quantificação da surfactina produzida.

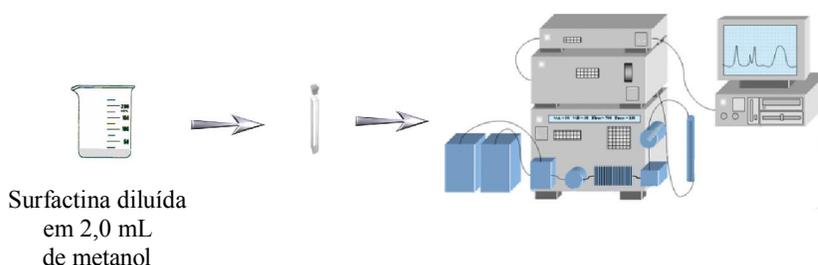


Figura 10 – Determinação da concentração de surfactina.

3.12 – Estimativa das velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato, formação de produto e conversão de substrato em produto

Os resultados obtidos nos ensaios com diferentes concentrações iniciais de substrato, açúcares redutores totais (ART = 12,71 g.L⁻¹, 22,92 g.L⁻¹, 48,96 g.L⁻¹, 65,04 g.L⁻¹, 96,10 g.L⁻¹) foram utilizados para a estimativa das velocidades específicas de crescimento, (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e formação de produto (μ_p), conforme metodologia descrita por Schmidell *et al.*, 2001. O comportamento relativo destas velocidades fornece uma importante classificação do processo fermentativo: a formação do produto pode ser associada, parcialmente associada ou não associada ao crescimento celular. Utilizou-se as Equações 3, 4

e 5 descritas por Schmidell *et al.* (2001), para calcular as velocidades específicas e posterior identificação do tipo de metabólito formado:

$$\mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \left(- \frac{dS}{dt} \right) \quad (4)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (5)$$

Para calcular a conversão do substrato em produto utilizou-se a equação 6:

$$\text{Conversão}(\%) = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad (6)$$

Onde S_0 é a concentração inicial do substrato e S a concentração de substrato nas amostras retiradas para análise em cada intervalo de tempo.

3.13 – Determinação da fase exponencial de crescimento

A partir dos dados de crescimento celular obtidos durante os ensaios fermentativos, a velocidade máxima de crescimento microbiano ($\mu_{x\text{máx}}$) foi obtida por linearização da curva de concentração celular em função do tempo (Schmidell *et al.*, 2001).

3.14 – Modelagem dos dados experimentais de produção de biomassa, produção de surfactina e consumo de substrato

Ajustaram-se modelos matemáticos aos dados experimentais por regressão não-linear (método dos mínimos quadrados), utilizando um software comercial (Solver - Microsoft Excel 2007). Foram avaliadas as Equações 6, 7, 8 e 9, propostas por Mercier *et al.*

(1992) para a modelagem matemática da produção de biossurfactantes, produção de biomassa e consumo de substrato, respectivamente.

A produção de biossurfactantes foi calculada de acordo com a Equação 7:

$$\frac{dP}{dt} = P_r \cdot P \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (7)$$

onde t é o tempo (h), P a concentração de biossurfactante (g/L), P_{\max} a concentração máxima de biossurfactante (g/L) e P_r a razão entre a taxa volumétrica de formação inicial do produto (r_p) e a concentração inicial do produto P_0 (g/L).

A Equação 8 pode ser diretamente resolvida obtendo-se a Equação 7:

$$P = \frac{P_0 P_{\max} e^{P_r t}}{P_{\max} - P_0 + P_0 e^{P_r t}} \quad (8)$$

onde P é a concentração de biossurfactante (g/L), t é o tempo (h), P_{\max} é a concentração máxima de biossurfactante (g/L) e P_r é a razão entre a taxa volumétrica de formação inicial do produto (r_p) e a concentração inicial do produto P_0 .

A Equação (9) representa a modelagem matemática da produção de biomassa:

$$X = \frac{X_0 X_{\max} e^{\mu_{\max} t}}{X_{\max} - X_0 + X_0 e^{\mu_{\max} t}} \quad (9)$$

onde X representa a concentração de biomassa (g/L), t o tempo (h), X_{\max} a concentração máxima de biomassa (g/L) e μ_{\max} (h^{-1}) a velocidade específica de crescimento máxima.

Representou-se o consumo do substrato modelado matematicamente pela Equação 10:

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{P/S}}(P - P_0) - \frac{1}{Y_{X/S}}(X - X_0) \quad (10)$$

onde $Y_{P/S}$ é o rendimento da produção de biossurfactante por consumo de substrato e $Y_{X/S}$ é o rendimento da produção de biomassa por consumo de substrato, P e P_0 são concentrações

final e inicial de biossurfactante em (g/L), X e X_0 são concentrações final e inicial de biomassa (g/L) e S e S_0 as concentrações inicial e final de substrato (g/L).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – Avaliação da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio mineral

4.1.1 – Avaliação do crescimento microbiano, consumo de substrato, produção de surfactina e pH

Para se avaliar a capacidade de produção de biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005, realizou-se ensaio de cultivo em mesa agitadora com temperatura controlada a 30°C e agitação de 180 rpm, retirando-se amostras periodicamente entre zero e 72 horas. Utilizou-se meio mineral para realização do ensaio, com concentração inicial de açúcares redutores totais (ART) de 40,87 g.L⁻¹. A Figura 11 mostra alguns dos parâmetros estudados para avaliação da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005.

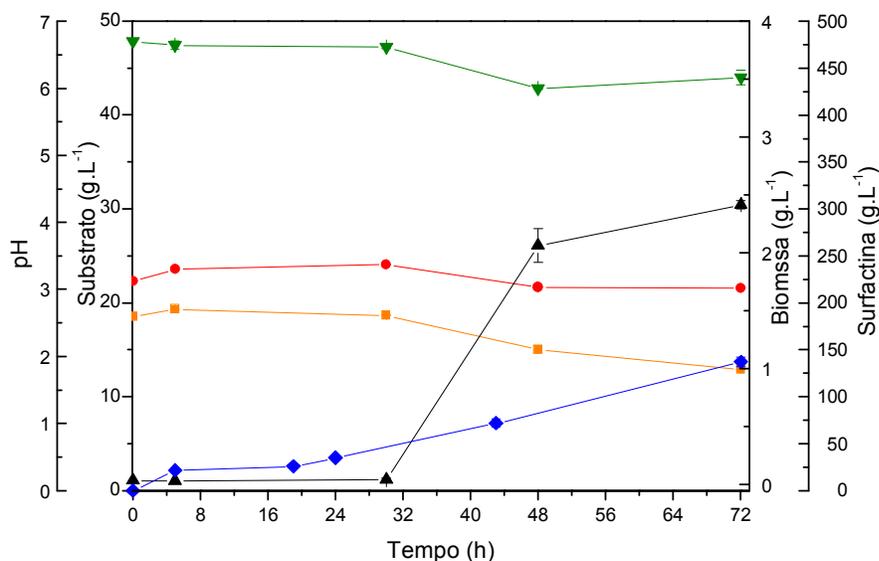


Figura 11 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *B. Subtilis* LAMI005 em meio mineral com concentrações iniciais de ART de 40,87 g.L⁻¹. (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) surfactina, (▼) pH.

Pode-se observar pela Figura 11 evidência de crescimento celular e baixo consumo de substrato. Obteve-se uma maior concentração de biomassa no tempo de 72 horas,

que atingiu a média de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$, apresentando-se ainda indícios de crescimento. Observa-se ainda uma longa fase de adaptação, que pode ser justificada pelo fato de haver apenas glicose no inóculo, enquanto que no meio de cultivo há também frutose, fazendo com que o microrganismo encontre um meio diferente e passe por mais um período de adaptação. Em relação ao substrato, ocorreu um consumo simultâneo de glicose e frutose. Haferberg *et al.* (1986) e Guerra Santos *et al.* (1984), relatam que microrganismos realizam a síntese de biossurfactantes utilizando, dentre outros, glicose e frutose como substrato. A Figura 11 mostra ainda, a concentração de surfactante produzida durante o ensaio realizado com *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio mineral. Observou-se que, a máxima concentração de surfactina obtida foi em torno de 137 mg.L^{-1} em 72 horas de ensaio, quando a biomassa e o produto apresentam-se crescentes. Kim *et al.* (1997) ao estudarem a produção e propriedades do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* C9 observaram que a produção de biossurfactante foi associada ao crescimento. Os autores verificaram ainda uma relação quase paralela entre, a produção de biossurfactantes, crescimento celular e utilização de glicose. Giro *et al.* (2009) utilizando o mesmo meio em ensaio em biorreator de bancada obteve concentração máxima de 232 mg.L^{-1} com 48 horas de ensaio e o produto manteve-se constante até 72 horas, comportamento semelhante ao observado no presente estudo.

Pode-se observar na Figura 11 o comportamento do pH durante o ensaio fermentativo em função do tempo. Pode-se verificar que houve decréscimo no valor de pH, porém o meio não chegou a faixas extremas de acidez. O pH ficou numa faixa entre 6,0 e 7,0. Sabe-se que o pH é um fator que pode afetar a produção de biossurfactantes. Barros *et al.* (2008), estudou as propriedades emulsificantes e a estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira e quando comparou valores de tensão superficial frente à variação do pH, observou que os menores valores, $27,5$ e $28,5 \text{ dina.cm}^{-1}$, correspondem aos pH 6 e 8, respectivamente, ou seja, o ideal para uma boa redução de tensão e conseqüentemente uma boa produção de biossurfactantes é uma faixa de pH próxima à neutralidade. Em pH ácido, há precipitação da surfactina, ocasionando elevação da tensão superficial. Kim *et al.* (1997) ao estudarem a produção e propriedades do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* C9 verificaram aumento da tensão superficial quando submeteram o meio rico em surfactina a pH abaixo de 4,0. Em pH entre 5,0 e 9,5 os autores relatam estabilidade na tensão superficial. A acidificação causa a precipitação do surfactante, mascarando os reais resultados de biossurfactante presentes no meio. Observou-se neste ensaio que o pH manteve-se entre 6,0 e 7,0 e não apresentou elevação da tensão superficial do

meio ou diminuição da concentração do produto ao longo do tempo, não ocasionando precipitação nesta condição estudada.

4.1.2 – Tensão Superficial

A análise de tensão superficial foi utilizada como método indireto para se avaliar a produção de biossurfactante, pois o mesmo diminui a tensão superficial do meio (Lima Lobato *et al.*, 2002; Nitschke *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002a, Rocha *et al.*, 2006). Pode-se observar pela Figura 12, uma significativa redução na tensão superficial ao longo do tempo. O menor valor desta variável foi observado no tempo de 72 horas, que foi em torno de 27 dyna.cm^{-1} . Nitschke *et al.*(2003) realizaram ensaios para avaliar resíduos agroindustriais como substratos para produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.* e utilizaram meio sintético definido por Cooper *et al.*(1981) como comparativo em seus estudos, obtendo redução média na tensão superficial de apenas 21,5%. Obteve-se no presente teste uma redução média de 55%.

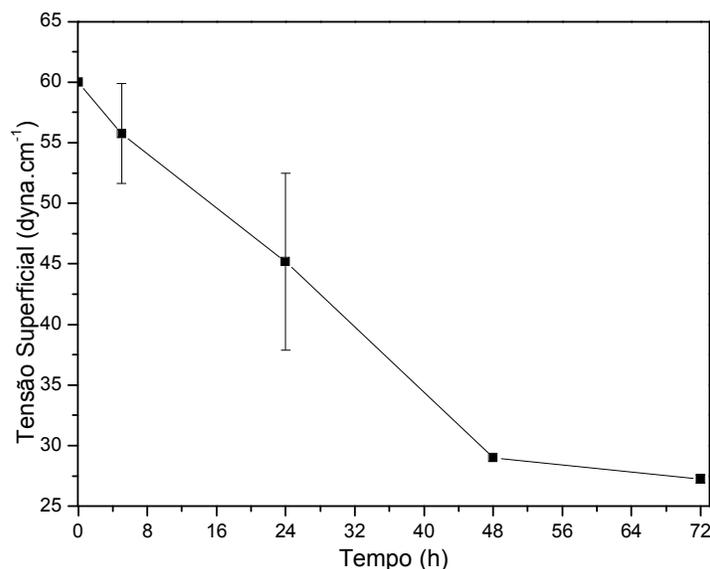


Figura 12 – Redução da tensão superficial em função do tempo para o ensaio utilizando meio mineral com concentração inicial de ART de $40,87 \text{ g.L}^{-1}$ realizado em *shaker* a 180 rpm, 30°C por 72 horas.

4.1.3 – Índice de emulsificação e atividade emulsificante

A capacidade de um biossurfactante de estabilizar emulsões é outro parâmetro utilizado para avaliar a atividade superficial dos surfactantes, sendo o índice de emulsificação a análise que determina a capacidade do bioemulsificante em formar emulsões (Batista *et al.*, 2006). Além disso, substâncias que apresentam essa capacidade apresentam importância significativa na composição de produtos de vários setores da indústria, como cosméticos, alimentos e ainda detergentes ou agentes de limpeza (Costa, 2005). No presente trabalho foram analisadas amostras nos tempos de 48 e 72 horas de ensaio quanto a sua capacidade em formar emulsões estáveis. Pode-se observar na Tabela 7 o comportamento dos meios contendo biossurfactante frente a três fontes hidrofóbicas testadas. A amostra de 48 horas de ensaio, só foi capaz de manter a emulsão formada durante 24 horas de análise, utilizando n-hexadecano. Já com os outros hidrocarbonetos utilizados, óleo de soja e querosene, houve formação de emulsão nas primeiras horas, mas esta não se manteve estável ao longo do tempo observado. A amostra de 72 horas de cultivo foi capaz de emulsificar e manter a emulsão utilizando apenas óleo de soja, e não formou emulsão em n-hexadecano e querosene.

Tabela 7 – Índice de Emulsificação (%) da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005 das amostras dos tempos de 48 e 72 horas em ensaio com concentração inicial de ART de 40,87 g.L⁻¹ realizado em *shaker* a 180 rpm, 30°C por 72 horas.

Amostra	Índice de Emulsificação (%)		
	n-hexadecano	Querosene	Óleo de soja
48	32 ± 0,4	NF	NF
72	NF	NF	12 ± 0,1

Nota: NF: não formou emulsão

A atividade emulsificante, que avalia a estabilidade da emulsão e o Índice de Emulsificação (IE₂₄), são importantes parâmetros de avaliação do poder de um emulsificante (Cooper e Goldenberg, 1987; Abu-Ruwaida *et al.*, 1991; Nitschke, 2004; Costa, 2005). A estabilidade de uma emulsão está relacionada, assim, ao comportamento do equilíbrio da fase óleo/água/surfactante formada pela ação deste último (Urum e Pekdemir, 2004). Uma unidade de atividade emulsificante foi definida como a quantidade de biossurfactante que mudou a absorbância da fase aquosa a 540 nm (A₅₄₀) por 1,0 (Cirigliano e Carman, 1985). A Figura 13

mostra o comportamento da estabilidade da emulsão através da análise de Atividade Emulsificante (U). A análise foi realizada durante 50 minutos, com avaliação de 10 em 10 minutos. Utilizaram-se apenas as amostras dos tempos de ensaio de 48 e 72 horas devido a concentração de surfactina no meio fermentado ser pequena nas amostras de 8 e 72 horas, pois o volume de meio fermentado utilizado nesta análise é muito pequeno, apenas 0,5 mL, não para obtendo-se uma boa estabilidade da emulsão em meios fermentados com baixa quantidade de biossurfactante. Tanto a amostra do tempo de 48 horas quanto a amostra de 72 horas, mostraram estabilidade da emulsão ao longo dos 50 minutos de observação. Pode-se observar que a emulsão no tempo de 48 horas apresenta valores próximos de 1,7 U e no tempo de 72 horas valores entre 1,0 e 1,5 U. Estes valores comprovam a pouca variação da estabilidade da emulsão ao longo do tempo.

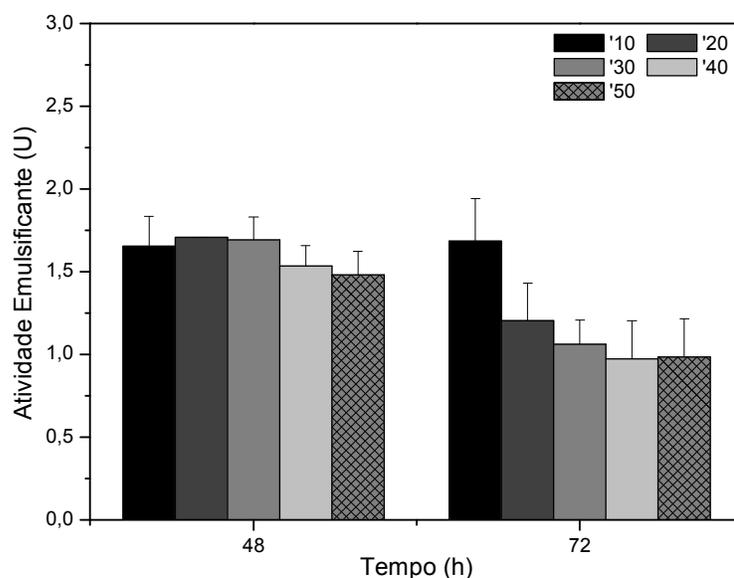


Figura 13 – Atividade emulsificante (U) da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005 das amostras de 48 e 72 horas de ensaio utilizando querosene como agente emulsificante.

Os resultados obtidos utilizando meio mineral mostraram que o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 é um bom produtor de biossurfactante. Métodos indiretos, como redução na tensão superficial e capacidade de manter emulsões estáveis, indicaram a produção de biossurfactantes. Martins *et al.* (2009), ao realizarem estudo cinético da produção de biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado em meio mineral e suco de caju clarificado, em biorreator de bancada, obtiveram concentrações de surfactina em meio

mineral em torno de 57 mg.L^{-1} após 24 horas de fermentação e 116 mg.L^{-1} tendo suco de caju clarificado como meio de cultivo. Neste trabalho, o maior valor de concentração de surfactina, $137,22 \text{ mg.L}^{-1}$, foi obtido após 72h de fermentação. Ressalta-se que neste ensaio, realizado em mesa agitadora, a concentração inicial de substrato foi superior a utilizada por Martins *et al.* (2009). Observou-se também uma longa fase de adaptação do microrganismo no meio de cultura (Figura 11), superior a 28 h. Resultado este não observado por Martins *et al.* (2009).

4.2 – Avaliação da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 e consumo de ART em diferentes meios de cultivo

Após estudos do potencial de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 em meio mineral, avaliou-se a influência da suplementação de outros nutrientes no crescimento microbiano e na produção de surfactina. Estes ensaios foram conduzidos em batelada por 30 horas, visando uma comparação entre os meios, denominados A, B, C, D e E conforme apresentado na Tabela 6 descrita em Materiais e Métodos. O inóculo utilizado nos ensaios A, B, C, D e E foi o mesmo citado no item 3.4 em Materiais e Métodos, para os ensaios realizados utilizando suco de caju como substrato.

4.2.1 – Avaliação do crescimento microbiano, conversão do substrato e produção de surfactina

A Figura 14 mostra o perfil da concentração de biomassa, consumo de substrato e formação de produto (surfactina), após 30 horas de fermentação utilizando os meios de cultivo A, B, C, D e E descritos na Tabela 6.

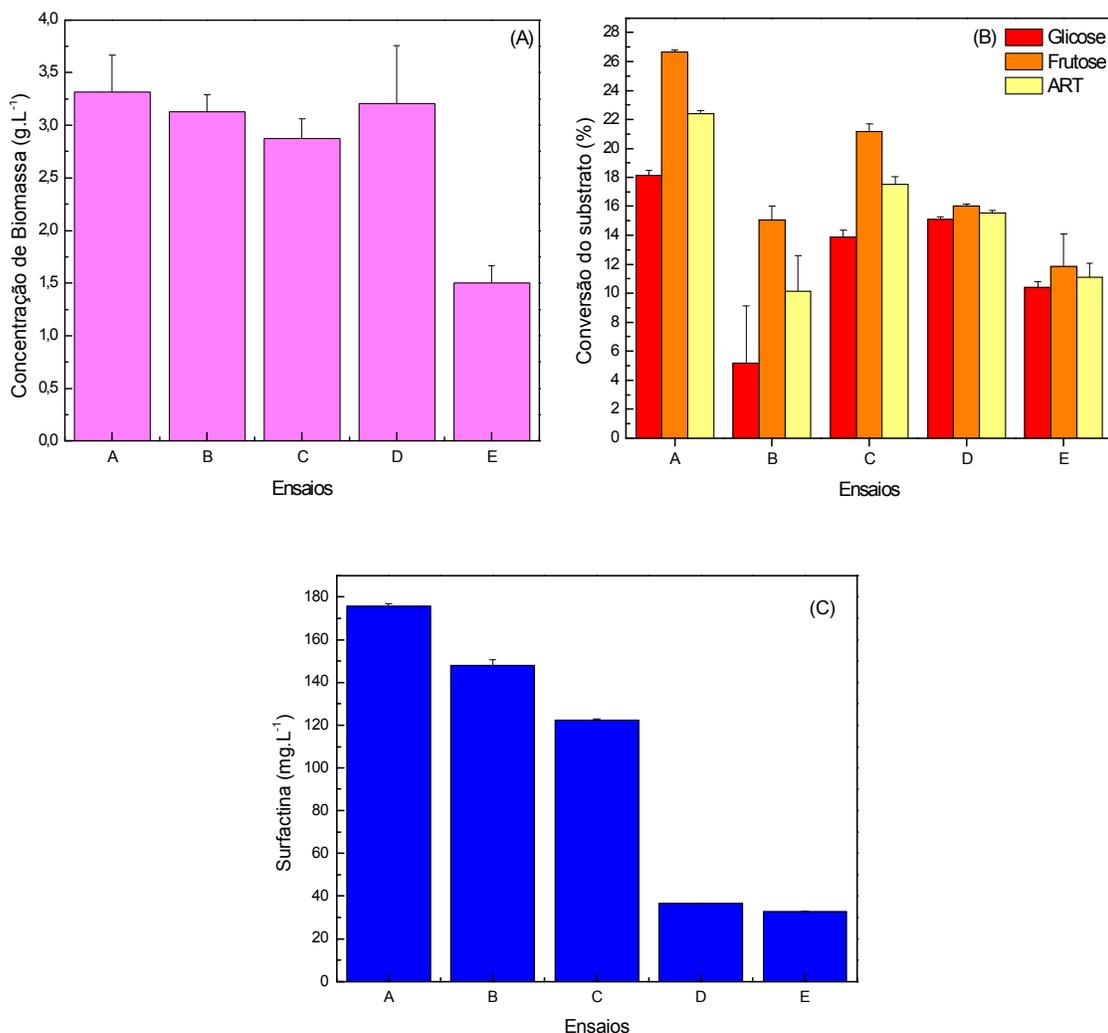


Figura 14 – Perfil do crescimento celular (A), conversão do substrato (B) e produção de surfactina (C) em função do tempo para ensaios realizados em *shaker* utilizando *Bacillus Subtilis* LAMI005 cultivado em meio contendo suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART \pm 40 g.L⁻¹ utilizando os meios de cultivo A, B, C, D e E.

Pode-se observar nos gráficos representados na Figura 14 que houve consumo de glicose e frutose, com preferência por frutose. Maiores valores de conversão de substrato foram obtidos nos ensaios A e C. Para a concentração de surfactina e de biomassa, maiores valores, em torno de 175 mg.L⁻¹ e 3,2 g.L⁻¹, respectivamente, foram obtidos no Ensaio A. O ensaio B foi o segundo melhor para a produção de surfactina, atingindo-se concentrações de em torno de 145 mg.L⁻¹, seguido do ensaio C, com concentrações de surfactina de 120 mg.L⁻¹. Os ensaios D e E foram os que apresentaram resultados pouco satisfatórios, com uma média de concentração de surfactina de apenas 36 mg.L⁻¹ e 32 mg.L⁻¹, respectivamente. Makkar e Cameotra (2002) ao estudarem os efeitos de vários suplementos nutricionais na produção de

biossurfactante por uma cepa de *Bacillus subtilis* MTCC 2423, utilizando meio mineral, obtiveram concentrações de biossurfactantes em torno de 342,0 mg.L⁻¹ sem adição de suplemento, 624,0 mg.L⁻¹ com cloreto de cálcio, 389,0 mg.L⁻¹ com adição de elementos traço, dentre outros.

A Tabela 8 mostra os valores de tensão superficial, medida indireta para determinar a produção de biossurfactantes, para os meios de cultivo A, B, C, D e E. Conforme os resultados apresentados, verifica-se que os ensaios A, B e C foram os que apresentaram maior redução na tensão superficial. Alcançaram-se tensões em torno de 29,5 dina/cm, comprovando que houve uma boa produção de surfactina, pois sabe-se que valores de tensão superficial abaixo de 35 dina/cm, indicam a presença de biossurfactante (Mulligan *et al.*, 2005). Como os Ensaios A e B apresentaram melhores resultados em apenas 30 horas de ensaio, resolveu-se avaliar a produção de biossurfactantes com os respectivos meios de cultivo por 72 horas.

Tabela 8 – Resultados da Tensão Superficial (TS) para ensaios realizados em *shaker* a 30°C e 180 rpm, utilizando *B. subtilis* LAMI005 com diferentes meios de cultivo e concentração de ART em torno de 40 g.L⁻¹.

Tempo (h)	A	B	C
	TS (dina/cm)	TS (dina/cm)	TS (dina/cm)
MC	56,95 ± 0,1	50,38 ± 0,2	52,65 ± 0,2
30	29,89 ± 0,0	29,92 ± 0,0	29,33 ± 0,0
Tempo (h)	D		E
	TS (dina/cm)		TS (dina/cm)
MC	52,73 ± 0,2		49,90 ± 0,0
30	36,26 ± 0,2		35,73 ± 0,0

Nota: MC: meio de cultura antes do inóculo; TS: tensão superficial.

4.3 – Influência da suplementação do meio de cultivo (CAJC + (NH₄)₂SO₄) com solução de micronutrientes

Para dar continuidade aos estudos realizados utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005, foram realizados ensaios por 72 horas com os dois melhores meios de cultivo estudados: um utilizando suco de caju clarificado com concentrações iniciais de ART de 48,96 g.L⁻¹ e suplementação de fonte de nitrogênio com sulfato de amônio na concentração de

1,0 g.L⁻¹ (Ensaio A) e outro (Ensaio B) com concentrações iniciais de ART de 40,65 g.L⁻¹ adicionando 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio e 0,1% de solução de micronutrientes. As Figuras 16 e 17 mostram o perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para os ensaios A e B, respectivamente.

Pode-se observar pela Figura 15 que a biomassa apresenta-se na fase exponencial de crescimento, etapa na qual as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. Este comportamento predominou durante todo o ensaio. A maior concentração de biomassa obtida foi em torno de 7,5 g.L⁻¹ no tempo de 72 horas. Observando o consumo de substrato, verificou-se que o microrganismo mostrou preferência por glicose. No entanto, houve baixo consumo de substrato, em torno de 14 g.L⁻¹, correspondente a 30% em média, dos açúcares redutores totais (ART). Acredita-se que ao se aumentar a concentração inicial de ART, através de uma menor diluição do suco de caju, outros nutrientes presentes no suco (como diversos aminoácidos e proteínas, além de sais minerais como manganês, potássio, ferro, zinco, entre outros) também sofreram um aumento na sua concentração, desviando a preferência do microrganismo das principais fontes de carbono, glicose e frutose. A produção de surfactina foi crescente nas primeiras 24 horas, estabilizando-se até 48 horas e decrescendo ao seguir para 72 horas. Maiores concentrações de surfactina foram obtidas nos tempos de 24 e 48 horas, aproximadamente 176 mg.L⁻¹ e 178 mg.L⁻¹, respectivamente. O consumo de substrato (glicose e frutose) foi pequeno. Kim *et al.* (1997) quando cultivaram *B. subtilis* C9 em meio sintético, utilizando glicose como fonte carbono, observaram uma relação direta entre crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo de carboidratos. Neste trabalho, obteve-se um resultado diferente, pois se verificou um contínuo crescimento celular, baixo consumo de glicose e frutose, havendo estabilização/declínio na produção de surfactina após 24h, mesmo se observando crescimento celular e presença de ART no meio. Pode-se associar esta redução na concentração de surfactina ao efeito de precipitação causado quando a mesma se encontra em meio ácido, ou melhor, a acidez mascara a verdadeira concentração de surfactina, por haver precipitação do biossurfactante em meio ácido. O pH do presente ensaio (Figura 15) estava em torno de 6,5, decrescendo a partir de 24h e chegando até pH 4,0 ao fim de 72h. Barros *et al.* (2008) ao estudarem as propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira verificaram que houve uma brusca elevação na tensão superficial do meio contendo surfactina quando o pH foi reduzido de 6 para 4, e que tal fato se deve à precipitação da surfactina em meio ácido. Porém, quando

neutralizaram o meio rico em surfactina os autores verificaram que a tensão superficial reduziu novamente. Este resultado mostra que há apenas uma precipitação da surfactina em meio ácido e, com a neutralização da amostra, o biossurfactante torna-se solúvel, reduzindo, deste modo, a tensão superficial. O fato de o valor de tensão superficial reduzir com a neutralização, em pH igual a 6, mostra a dependência das propriedades surfactantes da surfactina em relação ao pH. Fonseca *et al.* (2007) observaram fato semelhante quando estudaram a otimização da relação carbono/nitrogênio para a produção de biossurfactantes por uma linhagem de *Bacillus subtilis*. Observaram em diversas condições estudadas, que a tensão superficial do meio contendo surfactina aumentava em pH ácido, mas a acidificação do meio não interferiu na produção do biossurfactante, fato este não semelhante no presente estudo, pois observa-se que em pH em torno de 5,0 com 72 hora de fermentação obteve-se menor concentração de surfactina.

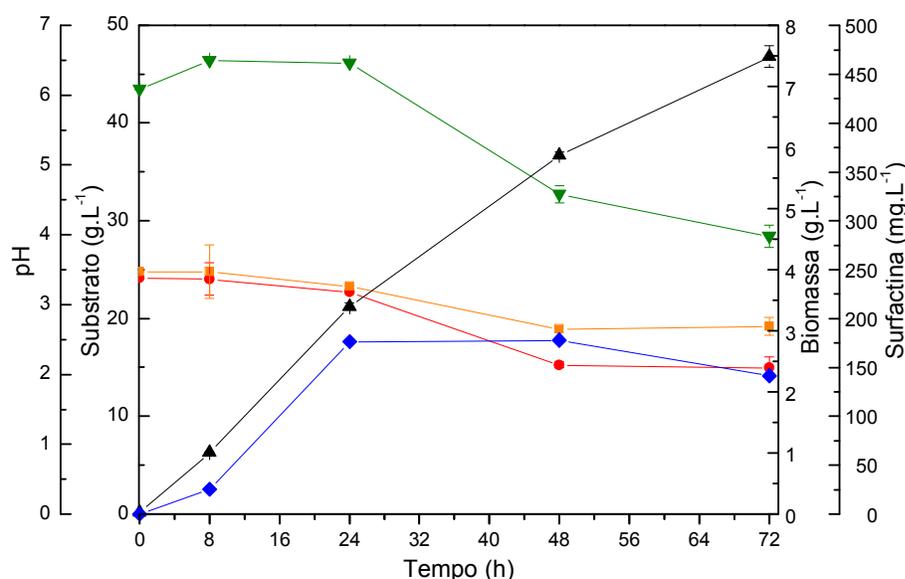


Figura 15 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) e concentrações iniciais de ART de 48,96 g.L⁻¹ + sulfato de amônio (1,0 g.L⁻¹). (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.

A Figura 16 mostra o perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para o ensaio com concentrações iniciais de ART de 40,65 g.L⁻¹ com adição de 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio e 0,1% de solução de micronutrientes – Ensaio B. O ensaio foi realizado em paralelo ao anterior, para avaliar se a

adição de solução de micronutrientes influenciaria a produção de biossurfactantes. A concentração de biomassa foi bastante expressiva, entrando na fase exponencial com 8 horas de ensaio e apresentando-se em contínuo crescimento, perfil este semelhante ao ensaio descrito anteriormente. A maior concentração de biomassa obtida foi em torno de $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ no tempo de 72 horas. Pode-se observar em relação ao consumo de substrato, que o microrganismo mostrou uma pequena preferência por frutose, comportamento diferente do ensaio anterior, onde houve maior consumo de glicose. Assim como no ensaio anterior, houve baixo consumo de substrato, apresentando-se em torno de 32%. Resultado este contrário ao observado por Giro *et al.* (2009) que trabalhando com o mesmo microrganismo (*B. subtilis* LAMI005) em meio mineral e tendo suco de caju clarificado (CAJC) como fonte de carbono com concentrações de ART em torno de 20 g.L^{-1} , observaram que a glicose foi consumida preferencialmente pelo microrganismo e obtiveram consumo total ao final de 48 horas de ensaio.

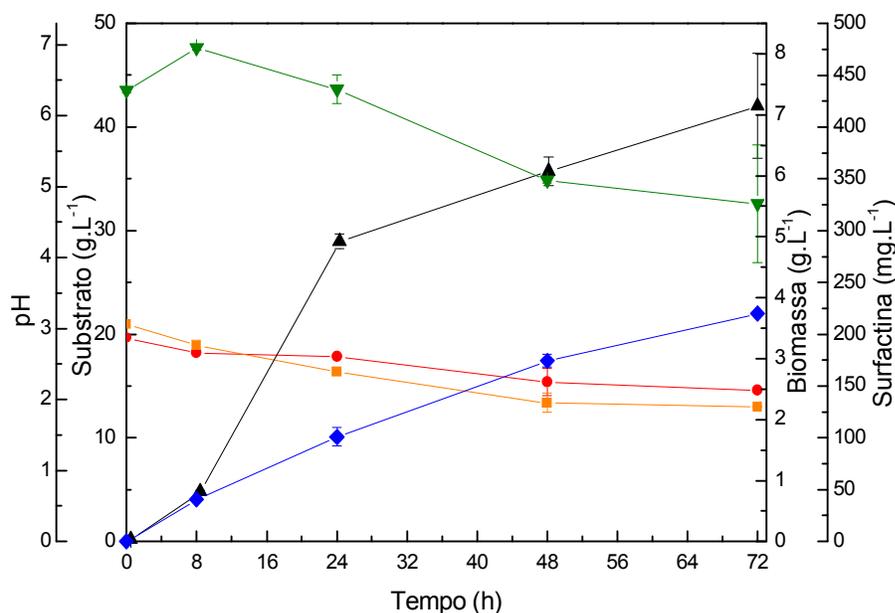


Figura 16 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de $40,65 \text{ g.L}^{-1} + 1,0 \text{ g.L}^{-1} + 0,1\%$ de solução de micronutrientes. (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.

A concentração de surfactina mostrada na Figura 16 apresentou aumento ao longo do tempo, atingindo concentrações em torno de 219 mg.L^{-1} após 72 horas de fermentação. Verificou-se que o pH chegou a valores em torno de 5,0, mas não causou diminuição na

concentração de surfactina, apesar de estar em faixa ácida. Obteve-se no presente ensaio uma maior concentração de biossurfactantes, aproximadamente 23% maior, que a obtida no Ensaio A. Essa diferença pode ser justificada tanto pela concentração inicial de ART que é um pouco diferente de um Ensaio para outro, quanto pela acidificação ocorrida no Ensaio A, que pode ter ocasionado a precipitação da surfactina, impossibilitando a quantificação correta. Os resultados obtidos apresentam uma relação direta entre crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo de carboidratos, semelhantes aos descritos por Kim *et al.* (1997) quando cultivaram *B. subtilis* C9 em meio sintético.

A Tabela 9 descreve o custo da matéria prima e dos reagentes e utilizados para preparação dos meios de cultivo em que se obteve maiores concentrações de surfactina. Os preços foram obtidos a partir do site da empresa APROLAB, que comercializa reagentes, e o custo da matéria-prima (caju), junto as Centrais de Abastecimento do Ceará - CEASA, conforme período vigente.

Conforme Tabela 9, verificou-se que o meio de cultivo utilizando apenas suco de caju e sulfato de amônio é o mais economicamente viável quando comparado ao meio mineral, que chega a exigir investimento quase 4 vezes maior, seguido do meio com adição de solução de micronutrientes, necessitando investimento 2 vezes maior. Uma caixa de caju comprada nas Centrais de Abastecimento do Ceará (CEASA) comporta em média 25 Kg de pseudofruto e fruto e estima-se que essa quantidade gere em torno de 24 litros de suco. Vale salientar que o ensaio com adição de solução de micronutrientes apresentou uma produção de biossurfactante de apenas 23% a mais que o ensaio sem adição da solução supracitada, e que esta diferença pode ter acontecido devido a diferença das concentrações iniciais de ART de um ensaio para outro, bem como devido a acidificação do meio ao logo do processo fermentativo, que ocasiona precipitação da surfactina, interferindo nos resultados de quantificação da mesma. Como o meio utilizando suco de caju clarificado como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio apresentou uma boa produção de biossurfactantes, além de possuir uma composição simples e de baixo custo, este meio de cultivo foi utilizado para realizar ensaios a fim de avaliar a influência da concentração inicial da fonte de carbono (glicose e frutose) e a relação C/N na produção de surfactina.

Tabela 9 – Custo dos reagentes utilizados na preparação dos meios de cultivo.

Reagente / Matéria Prima	Custo (R\$)	Custo (R\$) em g/L	Meio Mineral (meio sintético)	Meio A (CAJC)	Meio B (CAJC) + Micronutrientes
Caju – caixa 150 a 200 unidades	17,00	0,85		X	X
(NH ₄) ₂ SO ₄ – frasco 500 g	12,40	0,025	X	X	X
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O - frasco 500g	25,05	0,36	X		
KH ₂ PO ₄ – frasco 500 g	37,70	0,23	X		
NaCl - frasco 500 g	08,22	0,044	X		
MgSO ₄ .7H ₂ O – frasco 500 g	12,90	0,02	X		
D-Glucose PA - frasco 500 g	21,25	0,43	X		
D-Frutose PA – frasco 100 g	14,17	0,24	X		
ZnSO ₄ .7H ₂ O – frasco 500 g	37,70	0,83	X		X
FeSO ₄ .7H ₂ O – frasco 500 g	18,72	0,19	X		X
MnSO ₄ .H ₂ O – frasco 500 g	57,94	0,18	X		X
CuSO ₄ .5H ₂ O – frasco 500 g	28,84	0,022	X		X
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O – frasco 100 g	234,03	0,12	X		X
NaB ₄ O ₇ .10H ₂ O - frasco 500 g	21,25	0,007	X		X
EDTA Sal Dissódico - frasco 250 g	144,21	0,72	X		X
Custo Total	-----	-----	3,42	0,87	2,00

Nota: S.M: Solução concentrada de micronutrientes

4.4 – Estudo da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado (CAJC) suplementado com sulfato de amônia: Avaliação do crescimento celular, consumo de substrato, produção de biossurfactante e pH

Para dar continuidade a produção de biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005, realizaram-se ensaios de cultivo em mesa agitadora com temperatura controlada a 30 °C e 180 rpm, variando as concentrações de ART presentes no suco de caju clarificado de 12,71 à 96,10 g.L⁻¹ e mantendo-se constante a concentração e o tipo da fonte de nitrogênio, 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio. Procurou-se com esses ensaios, observar a influência da relação C/N na produção de biossurfactante utilizando o microrganismo acima citado, avaliando a relação entre o crescimento celular, o consumo de substrato e produção de surfactina ao longo do processo fermentativo.

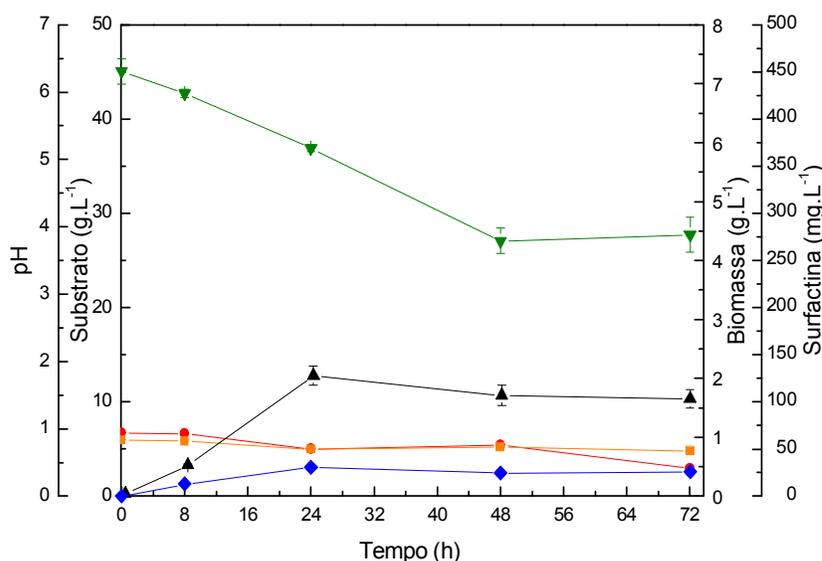


Figura 17 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 12,71 g.L⁻¹. (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.

Pode-se observar pela Figura 17, que houve baixo crescimento celular e pouco consumo de substrato, para o meio composto suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 12,71 g.L⁻¹. A maior concentração de biomassa obtida foi de 2,0 g.L⁻¹ no tempo de ensaio de 24 horas, e pode-se observar que a partir desse tempo (24

horas) houve um pequeno decréscimo no crescimento com tendência a entrar na fase estacionária de crescimento.

Observa-se que o microrganismo consumiu preferencialmente glicose à frutose durante o ensaio, entretanto, verifica-se a presença de uma expressiva quantidade residual de carbono ao final do processo fermentativo, restando em torno de 60%. Conforme alguns autores (Makkar e Cameotra, 1999; Peypoux *et al.*, 1999; Sandrin *et al.*, 1990; Yeh *et al.*, 2005), glicose e frutose são substratos adequados para a síntese de biossurfactantes, nutrientes estes presentes no suco de caju, que foram consumidos mas havendo sobras significativas. Este sobra pode estar relacionada ao crescimento celular, pois se observou que o mesmo entrou em fase estacionária em torno de 24 horas de ensaio.

Seguiram-se os ensaios mantendo a concentração de sulfato de amônio constante ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e aumentando as concentrações iniciais de ART no meio de cultura. Observa-se que para concentração inicial de ART de $22,92 \text{ g.L}^{-1}$, obteve-se uma biomassa em torno de $5,3 \text{ g.L}^{-1}$ em 72 h de ensaio. Para o mesmo tempo de ensaio, obteve-se uma concentração de $8,6$ e $8,4 \text{ g.L}^{-1}$ de massa celular quando se trabalhou com aumento da concentração de ART de $65,04$ e $96,10 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente. Provavelmente esse aumento de biomassa se deve ao aumento da relação C/N, no meio de cultura e/ou maior quantidade de carbono disponível. Observa-se ainda que a partir de 48 horas, a curva de biomassa apresentou tendência a manter-se constante, entrando na fase estacionária de crescimento nas concentrações de ART de $22,92 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 18), $65,04 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 19) e $96,10 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 20). Observa-se também, que o microrganismo, embora consuma as duas fontes de carbono (glicose e frutose), apresenta maior preferência pela frutose no ensaio contendo concentração inicial de ART de $65,04 \text{ g.L}^{-1}$, resultado este contrário ao observado por Giro *et al.* (2009) que trabalhando com o mesmo microrganismo (*B. subtilis* LAMI005), observou ser a glicose consumida preferencialmente pelo microrganismo. No ensaio utilizando concentração inicial de ART de $96,10 \text{ g.L}^{-1}$, pode-se observar o consumo simultâneo de ambos os carboidratos, ocorrendo um consumo mais intenso de glicose a partir de 48 horas. Nota-se, entretanto que há uma quantidade significativa de carbono residual durante todos os ensaios apresentados, resultado este também diferente do obtido por Giro *et al.* (2009), que observou um consumo total de glicose ao final de 48 horas de ensaio trabalhando com o mesmo microrganismo e mesma fonte de carbono, entretanto o suco era diluído em meio mineral. Davis *et al.* (1999) quando estudaram a influência da fonte de nitrogênio na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 observaram grande quantidade residual de glicose ao utilizarem 30 g.L^{-1} de

glicose como fonte de carbono e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, em condições aeróbias. Os autores observaram que não houve limitação da produção devido a fonte de carbono, pois a produção de surfactina apresentou-se crescente até o final do processo fermentativo e tornou-se intensa quando a fonte de nitrogênio (nitrato de amônio) estava esgotada. Acredita-se que a quantidade de fonte de carbono residual apresentadas no presente estudo se deva ao fato do aumento nas concentrações iniciais de ART e por haver também uma fonte de nitrogênio disponível ao microrganismo e o mesmo utilizá-la conjuntamente com a fonte de carbono para crescimento, dentre outros nutrientes presentes no suco de caju clarificado já mencionados, disponíveis no Anexo D, que conseqüentemente passam a estar disponíveis em maior quantidade à medida que se aumentam as concentrações de ART iniciais. Ainda assim, verificou-se que houve consumo simultâneo de glicose e frutose em todos os ensaios, porém em pequenas quantidades. Assim como Davis *et al.* (1999), não houve inibição da produção de surfactina pela fonte de carbono.

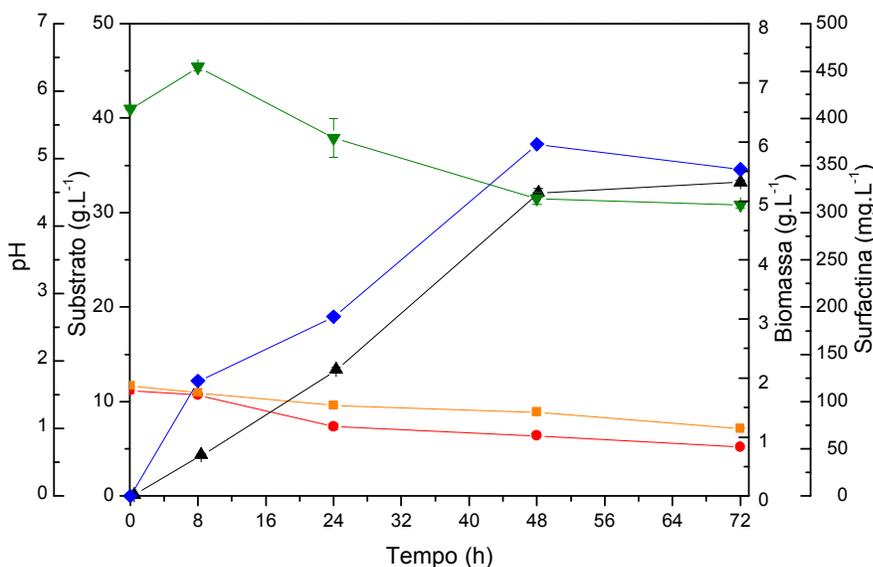


Figura 18 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de $22,92 \text{ g.L}^{-1}$. (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.

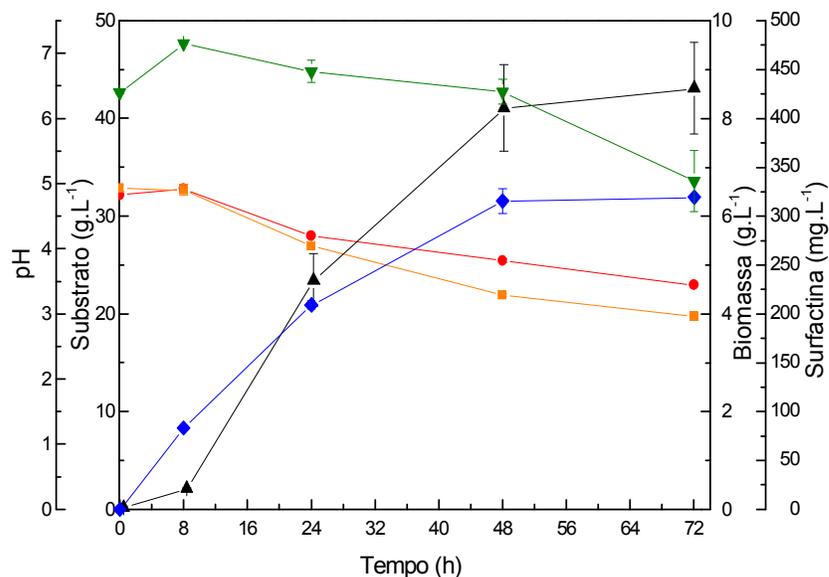


Figura 19 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 65,04 g.L⁻¹. (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.

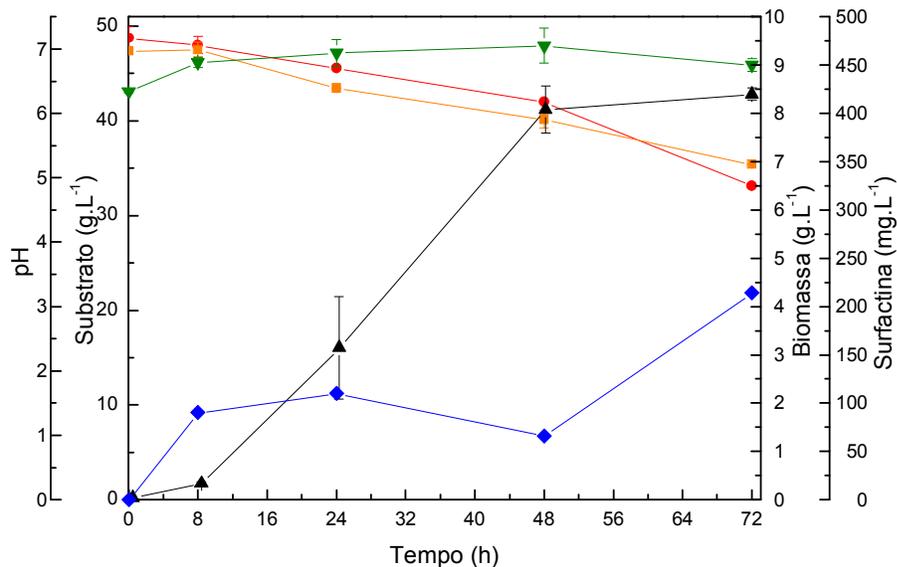


Figura 20 - Perfil do crescimento celular, consumo de substrato, produção de surfactina e pH em função do tempo para *Bacillus Subtilis* LAMI005 em meio com suco de caju clarificado (CAJC) com concentrações iniciais de ART de 96,10 g.L⁻¹ (suco não diluído). (▲) Biomassa, (●) Concentração de Glicose, (■) Concentração de Frutose, (◆) Surfactina, (▼) pH.

As Figuras 17 a 20 mostram também o perfil da concentração de surfactante produzido durante os ensaios realizados utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 nas diferentes

concentrações da fonte de carbono. A Tabela 10 destaca a maior concentração de surfactina obtidas nos diversos ensaios, bem como as concentrações de substrato e células no tempo da maior formação de produto. Pode-se observar que, a máxima concentração de surfactina obtida foi de 372,56 mg.L⁻¹ (Figura 18) quando foi utilizada concentração inicial de ART de 22,92 g.L⁻¹, resultado este três vezes melhor do que o obtido por Giro *et al.* (2009) que obteve 123 mg.L⁻¹ após 48 horas de cultivo em biorreator utilizando meio mineral contendo suco de caju clarificado com concentrações iniciais de ART em torno de 20 g.L⁻¹. Observa-se uma menor concentração (30,72 mg.L⁻¹), ao se utilizar pequena concentração de substrato, que foi 12,52 g.L⁻¹ de ART (Figura 18). Nos ensaios com concentrações iniciais de ART de 65,04 g.L⁻¹ (Figura 20) e 96,10 g.L⁻¹ (Figura 20), suco não diluído, a maior concentração obtida foi de 319,3 mg.L⁻¹ e 214,2 mg.L⁻¹, respectivamente. Observa-se que o produto começa a ser produzido nas primeiras horas de crescimento celular, ou seja, na fase logarítmica do crescimento microbiano. Verifica-se também que o aumento na formação de produto relaciona-se ao aumento de biomassa nos ensaios com concentrações iniciais de ART de 12,52 g.L⁻¹ (Figura 17), 22,92 g.L⁻¹ (Figura 18) e 65,04 g.L⁻¹ (Figura 19). No teste realizado com concentrações iniciais de ART de 96,10 g.L⁻¹ (Figura 20), observa-se um declínio no produto formado entre 24 e 48 horas de ensaio, não se observando o mesmo comportamento na biomassa. Este comportamento pode ser explicado por uma eventual falha na análise ou por perdas ocorridas durante o processo de extração. Segundo Kim *et al.* (1997), a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* C9 foi associado ao crescimento. Estes autores observaram que havia uma relação quase paralela entre a produção de biossurfactantes, o crescimento celular e a utilização de glicose. A produção de biossurfactante associada ao crescimento também foi relatada para *Bacillus licheniformis* JF-2 (Lin *et al.*, 1994) e *B. subtilis* (Cooper *et al.*, 1981). Entretanto, Zhang e Miller (1992), observaram que *Pseudomonas aeruginosa* pode produzir raminolipídios com alto rendimento só sob condições limitantes de crescimento. Sheppard e Mulligan (1987) relataram que a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 ocorria principalmente a partir do final da fase exponencial de crescimento, resultado contrário ao observado neste trabalho. Kim *et al.* (2006) relataram que a produção de biossurfactante ocorreu principalmente quando a fonte de nitrogênio foi esgotada, momento que acontece geralmente durante a fase estacionária do crescimento da biomassa, fato que tampouco foi observado na maioria dos ensaios aqui discutidos. Observou-se nas Figuras 17, 19, 20 e 20 na cinética de produção do biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005 a evidência do crescimento do microrganismo, baixo consumo de

substrato e uma boa produção de biossurfactante durante as 72 horas de cultivo utilizando suco de caju clarificado (CAJC).

Tabela 10 – Concentração de produto final, biomassa final, substrato inicial e final no tempo de maior produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado como meio de cultivo em diferentes concentrações de ART a 30°C, 180 rpm, por 72 horas.

Ensaio	S ₀ (g.L ⁻¹)	T _f (h)	S _f (g.L ⁻¹)	X _f (g.L ⁻¹)	P _f (mg.L ⁻¹)
1	12,71	24	10,01	2,05	30,72
2	22,92	48	15,33	5,14	372,56
3	48,96	48	34,18	5,88	177,94
4	40,65	72	27,60	7,14	219,99
5	65,04	72	42,71	8,61	319,32
6	96,10	72	68,53	8,4	214,17

NOTA: (1) ART 12,71 g.L⁻¹; (2) ART 22,92 g.L⁻¹; (3) ART 48,96 g.L⁻¹; (4) ART 40,65 g.L⁻¹ + micronutrientes; (5) ART 65,04 g.L⁻¹; (6) ART 96,10 g.L⁻¹.

No presente estudo avaliou-se o efeito da variação das concentrações da fonte de carbono sobre a produção de biossurfactante mantendo constante a fonte de nitrogênio. Pode-se observar na Tabela 10, que o ensaio contendo a maior concentração de ART não foi o que favoreceu a maior produção de surfactina, mostrando que o aumento na concentração da fonte de carbono não implica em maior obtenção de produto. O fato pode ser justificado pelo aumento nas diversas fontes de nutrientes presentes no suco de caju como aminoácidos, proteínas e sais minerais como ferro e manganês que de acordo com Wei e Chu, 2002 e Wei *et al.* (2004) são fatores importantes na produção de biossurfactantes por linhagens de *Bacillus*. Estes nutrientes são consumidos pelo microrganismo em paralelo com a fonte de carbono e nitrogênio, e como a relação C/N ainda apresenta-se um pouco elevada ao final do processo fermentativo, verifica-se que não ainda não há condições limitantes de nitrogênio para então haver aumento na produção de surfactina.

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microrganismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção, estando presentes todos estes nutrientes no suco de caju clarificado. Além disso, a influência da razão C/N é outro fator importante sobre a produção de biossurfactantes (Santa Anna, 2000; Sousa, 2008). Outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do

processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (Banat, 1995). O efeito da limitação de nutrientes para a produção de biossurfactantes tem sido estudado devido a sua importância sobre a lipogênese microbiana (Kosaric, 1992). Geralmente, o acúmulo de lipídeo intracelular é favorecido quando há limitação de algum nutriente no meio de cultivo. A limitação mais comumente utilizada é a limitação de nitrogênio. Desai e Banat (1997) relataram dentre diversos fatores que a produção de biossurfactante pode ser induzida quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio, condição esta aplicada no presente estudo, utilizando-se apenas 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio em todos os ensaios. De acordo com Mukherjee e Das (2005), o menor rendimento na produção de biossurfactantes associado à menor produção de biomassa bacteriana foi atribuído tanto ao tipo de fonte de carbono utilizada, quanto às altas salinidades do meio de cultura. Fernandes (2007) observou que o metabolismo de nitrogênio foi uma importante variável na produção de biossurfactantes, uma vez que tanto a fonte quanto a concentração de nitrogênio podem afetar a produção desses compostos (Makkar e Cameotra, 1997; Makkar e Cameotra, 1998; Davis *et al.* 1999).

A Figuras 17, 19, 20 e 20 ilustram ainda o perfil do pH no meio de cultivo suco de caju clarificado suplementado com a fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄). Pode-se observar que pH do meio CAJC apresentou um caráter bastante ácido ao final da maioria dos ensaios fermentativos, chegando próximo a pH 4,0, com exceção apenas para concentração de ART 96,10 g.L⁻¹ (Figura 20) onde se observou que o pH do meio permaneceu praticamente constante ao longo do tempo. Interessante observar que a surfactina, surfactante produzido no presente estudo, precipita em valores de pH ácidos, fato relatado por Barros *et al.* (2008) que também observaram em estudo utilizando o microrganismo *Bacillus subtilis* e manipueira como meio de cultivo, uma elevação na tensão superficial quando o pH foi reduzido de 6 para 4 e tal fato se deve, provavelmente, à precipitação do biossurfactante. Resultados semelhantes foram descritos por Kim *et al.* (1997). Costa (2005) também observou elevação da tensão superficial quando submeteu o meio rico em surfactina a pH abaixo de 4,0. Fox e Bala (2000) observaram durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em meio alternativo, usando batata como substrato, que o meio adquiriu caráter básico, sem a presença de tampões, atingindo valores de pH na faixa de 6,2 a 8,5. Reis *et al.* (2004) reportaram o mesmo comportamento na produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 6633 utilizando como meio de cultura material de baixo custo (açúcar comercial, cana de açúcar, óleo de soja e outros).

O pH está diretamente relacionado aos resultados de concentração de surfactina devido ao fato da mesma precipitar em valores de pH ácidos. Observando-se a Tabela 10 e as Figuras 17, 19, 20 e 20, pode-se verificar que em todos os ensaios no tempo de fermentação em que o pH começou a entrar em faixas ácidas, principalmente abaixo de pH 5,0 a análise de surfactina detecta redução nas concentrações. Observa-se, por exemplo, que para o experimento com concentração inicial de ART de 22,92 g.L⁻¹ (Figura 18), em 48h de ensaio, ponto em que foi detectada maior concentração de biossurfactante, o pH chega a valores em torno de 4,5, permanecendo constante, verificando-se nas amostras de 72h de ensaio que a concentração de surfactina foi inferior à concentração obtida em 48h. Diante dos resultados, existe a possibilidade de não haver queda na produção de surfactina, e sim a sua precipitação, fato que pode ter mascarado os resultados reais da concentração do produto nos ensaios fermentativos.

4.5 – Estudo cinético da produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005

4.5.1 – Determinação da fase exponencial de crescimento

A Tabela 11 mostra os valores obtidos do parâmetro cinético da fase exponencial de crescimento $\mu_{x\text{máx}}$ (h⁻¹), a partir da aplicação de ln(x) versus tempo após linearização, dos ensaios fermentativos utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) variando concentrações iniciais de ART.

Tabela 11 – Fase exponencial de crescimento dos ensaios fermentativos durante um período de 72 horas, utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) em *shaker* a 30°C, 180 rpm, variando concentrações iniciais de ART.

	1	2	3	4	5
$\mu_{x\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,151	0,170	0,175	0,189	0,177

NOTA: (1) 12,71 g.L⁻¹, (2) 22,92 g.L⁻¹, (3) 48,96 g.L⁻¹, (4) 65,04 g.L⁻¹ e (5) 96,10 g.L⁻¹.

Observa-se pelos valores que a velocidade específica máxima de crescimento são bastante semelhantes para todos os ensaios, embora os mesmos tenham sido realizados em diferentes concentrações de fonte carbono.

A Figura 21 mostra ajustes representativos da fase exponencial de crescimento para todos os ensaios utilizando diferentes concentrações iniciais de ART.

A partir dos dados de crescimento celular obtidos durante os ensaios fermentativos calculou-se o $\ln(x)$ para então obter-se a fase exponencial de crescimento microbiano. A Figura 22 mostra $\ln(x)$ em função do tempo e verificou-se através dela que todos os ensaios atingiram sua fase exponencial de crescimento no tempo de 24 horas, utilizando a metodologia descrita por Schmidel *et al.*, 2001.

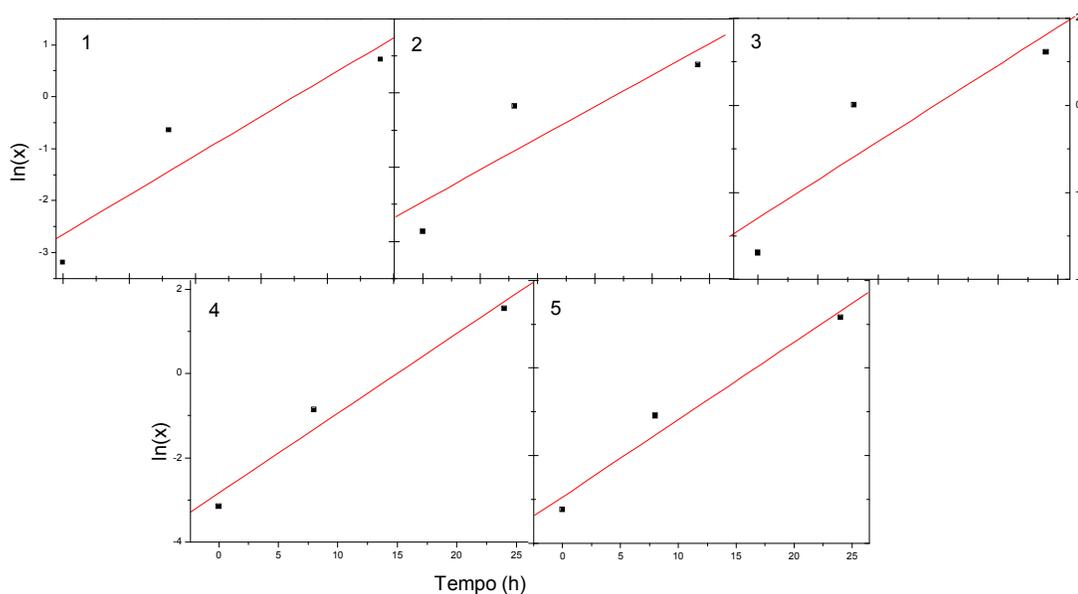


Figura 21 – Ajuste representativo para determinação da fase exponencial de crescimento dos ensaios fermentativos durante um período de 72 horas, utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) em *shaker* a 30°C, 180 rpm, variando concentrações iniciais de ART. (1) 12,71 g.L⁻¹, (2) 22,92 g.L⁻¹, (3) 48,96 g.L⁻¹, (4) 65,04 g.L⁻¹ e (5) 96,10 g.L⁻¹.

4.5.2 – Identificação do tipo de metabólito produzido nos ensaios fermentativos

A Figura 22 ilustra o comportamento das velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de biossurfactante (μ_p) para identificação do tipo de metabólito produzido nos ensaios fermentativos utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) como substrato, suplementado com sulfatado de amônio na concentração de 1,0 g.L⁻¹ variando as concentrações iniciais de ART.

Pode-se observar pela Figura 23 que as velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de biossurfactante (μ_p) apresentam perfis semelhantes, correlacionando-se muito bem, podendo se afirmar que a formação do produto é um metabólito primário e está associado ao crescimento. De acordo com Schmidell *et al.* (2001), esta configuração representa o caso em que o produto formado, o metabólito primário, está diretamente ligado às reações de catabolismo ou decomposição de substrato, neste caso, os açúcares. Kim *et al.* (1997) ao estudarem a produção e propriedades do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* C9 observaram que a produção de biossurfactante foi associada ao crescimento. Os autores verificaram ainda, uma relação quase paralela entre a produção de biossurfactantes, crescimento celular e utilização de glicose. Resultado semelhante foi observado no presente estudo, pois de acordo com os resultados apresentados na Figura 23, este perfil de metabólito primário foi predominante

Rocha (2007) ao trabalhar com *P.aeruginosa* ATCC 10145 cultivada em suco de caju integral testando diversas condições de cultivo, observou que a produção do biossurfactante aconteceu na maioria dos experimentos de forma associada ao crescimento, e que tal comportamento observado é típico de um metabólito primário. Vários biossurfactantes, tais como biotensoativos de *Candida tropicalis* IIP- 4, glicolipídeos de *Nocardia* sp. SFC-D e biossurfactantes insolúveis em água de *Torulopsis apicola*, são metabólitos secundários (Desai e Banat, 1987). Outros, como alguns ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp., glicoproteínas de *P. fluorescens* 378, agentes com atividade superficial de *B. cereus* IAF 346 e biodispersan de *Bacillus* sp. IAF-343 são considerados associados ao crescimento (Desai e Banat, 1987). Diversos fatores são responsáveis pelo tipo de metabólito formado, dentre os quais podem ser destacados o tipo de microrganismo a ser utilizado e o meio de cultivo em que o mesmo será cultivado.

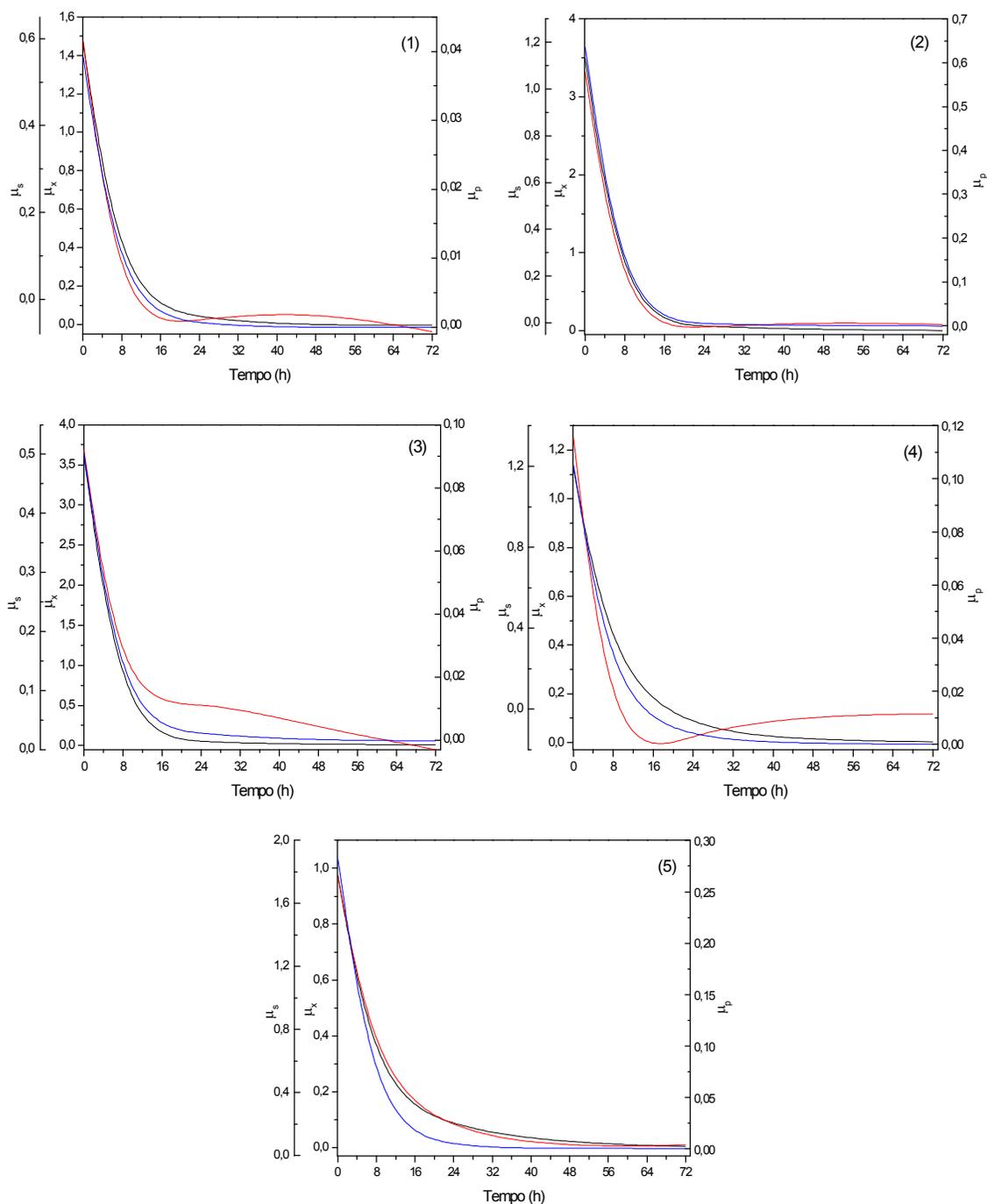


Figura 22 – Gráficos representativos para identificação do tipo de metabólito produzido nos ensaios fermentativos realizados por 72 horas, utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 e suco de caju clarificado (CAJC) em *shaker* a 30°C, 180 rpm, variando concentrações iniciais de ART. (1) 12,71 g.L⁻¹, (2) 22,92 g.L⁻¹, (3) 48,96 g.L⁻¹, (4) 65,04 g.L⁻¹ e (5) 96,10 g.L⁻¹. (—) μ_x , (—) μ_s , (—) μ_p .

4.6 – Modelagem matemática dos dados experimentais de produção de biomassa, produção de surfactina e consumo de substrato

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos da modelagem matemática para produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado variando as concentrações iniciais de ART.

Tabela 12 – Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo proposto por Mercier *et al.* (1992) aos dados experimentais por regressão não-linear a partir do método dos mínimos quadrados utilizando um software comercial (Solver - Microsoft Excel 2007).

Produção de Biomassa				
Concentração ART (g/L)	$\mu_{x\max}$ (h ⁻¹)	X _{max} (g/L)	X ₀ (g/L)	R ²
22,92	0,124	5,398	0,187	0,996
48,96	0,088	7,395	0,568	0,985
65,04	0,194	8,451	0,098	0,999
96,10	0,099	8,399	0,428	0,996
Produção de Surfactina				
Concentração ART (g/L)	P _{max} (g/L)	Pr	P ₀ (g/L)	R ²
22,92	0,367	0,098	0,042	0,953
48,96	0,165	0,536	0,001	0,967
65,04	0,319	0,155	0,014	0,999
96,10	0,215	0,072	0,036	0,913
Consumo de Substrato				
Concentração ART (g/L)	Y _{p/s} (g/g)	Y _{x/s} (g/g)	R ²	
22,92	0,228	0,655	0,901	
48,96	----	0,495	0,902	
65,04	0,999	0,405	0,994	
96,10	0,039	0,494	0,933	

O modelo proposto se ajustou bem aos dados experimentais, o que pode ser constatado pelos valores de R², que mostram valores na maioria dos ensaios, superiores a

0,95. Rodrigues *et al.* (2006) obtiveram resultados semelhantes ao estudar um meio de cultivo de baixo custo para produção de biossurfactantes por bactérias probióticas. Os autores relataram que o modelo matemático descreveu realisticamente os dados experimentais com R^2 superiores a 0,901, 0,944 e 0,917 para consumo de sacarose, crescimento da biomassa e produção de biossurfactante, respectivamente. A variação dos parâmetros cinéticos do produto podem ser justificados pelo fato do meio de fermentação apresentar pH ácido durante os ensaios fermentativos conforme previamente discutidos no item 4.4.

A Figura 23 representa o ajuste do modelo matemático por regressão não-linear (método dos mínimos quadrados), utilizando o software comercial (Solver - Microsoft Excel 2007), aos dados experimentais do ensaio realizado com concentrações iniciais de ART de $65,04 \text{ g.L}^{-1}$. Como o modelo matemático adequou-se bem para todos os ensaios fermentativos, optou-se por representar apenas uma situação para exemplificar.

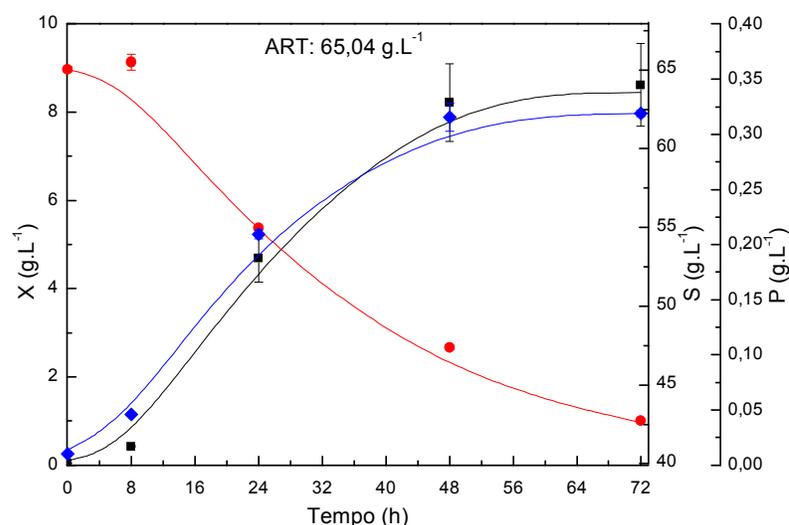


Figura 23 - Representação gráfica dos dados experimentais e dos dados calculados de concentração de biomassa, produção de biossurfactante e consumo do substrato em função tempo para o ensaio fermentativo com concentração inicial de ART de $65,04 \text{ g.L}^{-1}$. (■) X_{exp} , (—) X_{calc} ; (●) S_{exp} , (—) S_{calc} ; (◆) P_{exp} , (—) P_{calc} .

Pode-se observar o bom ajuste da modelagem realizada através da Figura 24 para produção de biomassa, consumo de substrato e produção de biossurfactantes no ensaio realizado com concentrações de ART de $65,04 \text{ g.L}^{-1}$, a 30°C , 180 rpm, por 72 horas. Rodrigues *et al.* (2006) em estudo cinético da produção de biossurfactantes por linhagens de *Lactobacillus*, não obteve bom ajuste do modelo matemático aplicado aos seus dados experimentais quando avaliou o consumo de lactose, obtendo um valor de $R^2=0,698$. Todos os

demais ensaios realizados variando a concentração inicial de ART apresentaram perfis semelhantes ao representado na Figura 24. Avaliando os valores obtidos de R^2 , o modelo matemático proposto no presente estudo ajustou-se bem aos dados obtidos nos ensaios fermentativos realizados, quando comparados à literatura citada.

4.7 – Caracterização do Biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 em suco de caju clarificado

4.7.1 – Índice de Emulsificação e Atividade Emulsificante

A estabilidade de emulsões óleo/água também é muito utilizada como um indicador de atividade superficial, embora a habilidade de uma molécula em formar uma emulsão estável não esteja associada à redução da tensão superficial (Youssself *et al.*, 2004). O índice de emulsificação determina a capacidade do bioemulsificante em formar emulsões e a capacidade de estabilizar emulsões é um parâmetro também utilizado para avaliar a atividade superficial dos surfactantes.

Observa-se pela Tabela 13 que no ensaio cujo meio continha a maior concentração de ART (96,10 g.L⁻¹), obteve-se um índice de emulsificação de 64% e 67% em 72 horas de ensaio utilizando, respectivamente, óleo de soja e querosene como agente emulsificante. Ao se utilizar gasolina, porém, não foi observada estabilidade na emulsão formada para nenhum dos meios de cultura, livre de células, avaliados. Pode-se observar também que quando se utilizou o meio de cultivo contendo a concentração inicial de ART = 48,96 g.L⁻¹, após em 48 horas de ensaio, obteve-se índice de emulsificação de 58% em óleo de soja e 67% em querosene. Quando se utilizou os meios contendo concentrações iniciais de ART de 65,04 g.L⁻¹, obtiveram-se índices em 72 horas de 53% e 66% em óleo de soja e querosene, respectivamente. Na concentração de ART 40,65 g.L⁻¹ + solução de micronutrientes, observou-se índice de emulsificação em 48 horas de 65% e 55% em óleo e querosene, respectivamente.

Tabela 13 – Índice de emulsificação (%) em diferentes concentrações de glicose utilizando o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005, em ensaios realizado em *shaker* a 30°C e 180 rpm.

Concentração inicial de ART (g.L ⁻¹)	Agente Emulsificante			
	Tempo (h)	Óleo	Querosene	Gasolina
12,71	24	NF	25 ± 0,0	NF
	48	NF	NF	NF
	72	NF	30 ± 0,0	NF
22,92	24	23 ± 0,0	NF	10 ± 0,0
	48	35 ± 0,0	05 ± 0,0	NF
	72	35 ± 0,0	10 ± 0,0	NF
48,96	24	27 ± 0,1	NF	NF
	48	58 ± 0,1	67 ± 0,0	37 ± 0,0
	72	54 ± 0,0	64 ± 0,0	NF
65,04	24	49 ± 0,0	NF	NF
	48	43 ± 0,0	48 ± 0,0	04 ± 0,0
	72	53 ± 0,1	66 ± 0,0	26 ± 0,2
96,10	24	24 ± 0,0	29 ± 0,0	NF
	48	40 ± 0,0	NF	NF
	72	64 ± 0,0	67 ± 0,0	NF
40,65 + Solução de Micronutrientes	24	05 ± 0,0	05 ± 0,0	NF
	48	65 ± 0,0	55 ± 0,0	0,40 ± 0,0
	72	48 ± 0,0	35 ± 0,0	NF

Nota: NF – não formou emulsão.

Os resultados mostraram que as emulsões formadas foram melhores e mais estáveis utilizando óleo de soja e querosene como agentes emulsificantes. Bicca *et al.* (1999) ao avaliarem a produção de biosurfactantes por 5 cepas de *Rhodococcus* obtiveram IE₂₄ em torno de 50% utilizando querosene. Costa *et al.* (2006) obtiveram índice de emulsificação com querosene de, aproximadamente, 70% para produção de ramnolípideos a partir de óleo de andiroba e de 64% para biosurfactante obtido a partir de óleo de buriti, utilizando *P. aeruginosa* LBI. Desta forma, o presente estudo mostrou resultados satisfatórios, em relação

ao índice de emulsificação, nos ensaios realizados com diferentes concentrações de fonte de carbono.

A Figura 24 mostra a capacidade emulsificante do meio rico em surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005 em querosene e óleo de soja. Pode-se observar Figura 24 que houve uma boa formação de emulsão das amostras fermentadas ricas em surfactina de 48 e 72 horas de ensaio, mostrando a eficiência do surfactante produzido no ensaio com concentrações de ART de 65,04 g.L⁻¹



Figura 24 – Capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 em querosene e óleo de soja.

Conforme ressaltado anteriormente, a atividade emulsificante determina a capacidade do biossurfactante produzido em formar emulsões óleo-água. A capacidade de estabilização da emulsão, ou seja, a habilidade em manter pelo menos 50% do volume da emulsão original 24h depois da sua formação, é um indício que o microrganismo está produzindo biossurfactante. Foi analisado através deste método, o efeito da relação C/N, onde a turbidez promovida pela dispersão da fase óleo na fase aquosa é determinada através da medida da absorbância a 540 nm.

Conforme resultados apresentados pela Figura 25 dos resultados de atividade emulsificante, para todas as concentrações de fonte de carbono estudadas, houve uma melhor emulsificação para as amostras do tempo de 72 horas de ensaio comparado ao tempo de 48 horas, comprovado através do aumento na estabilidade da atividade emulsificante.

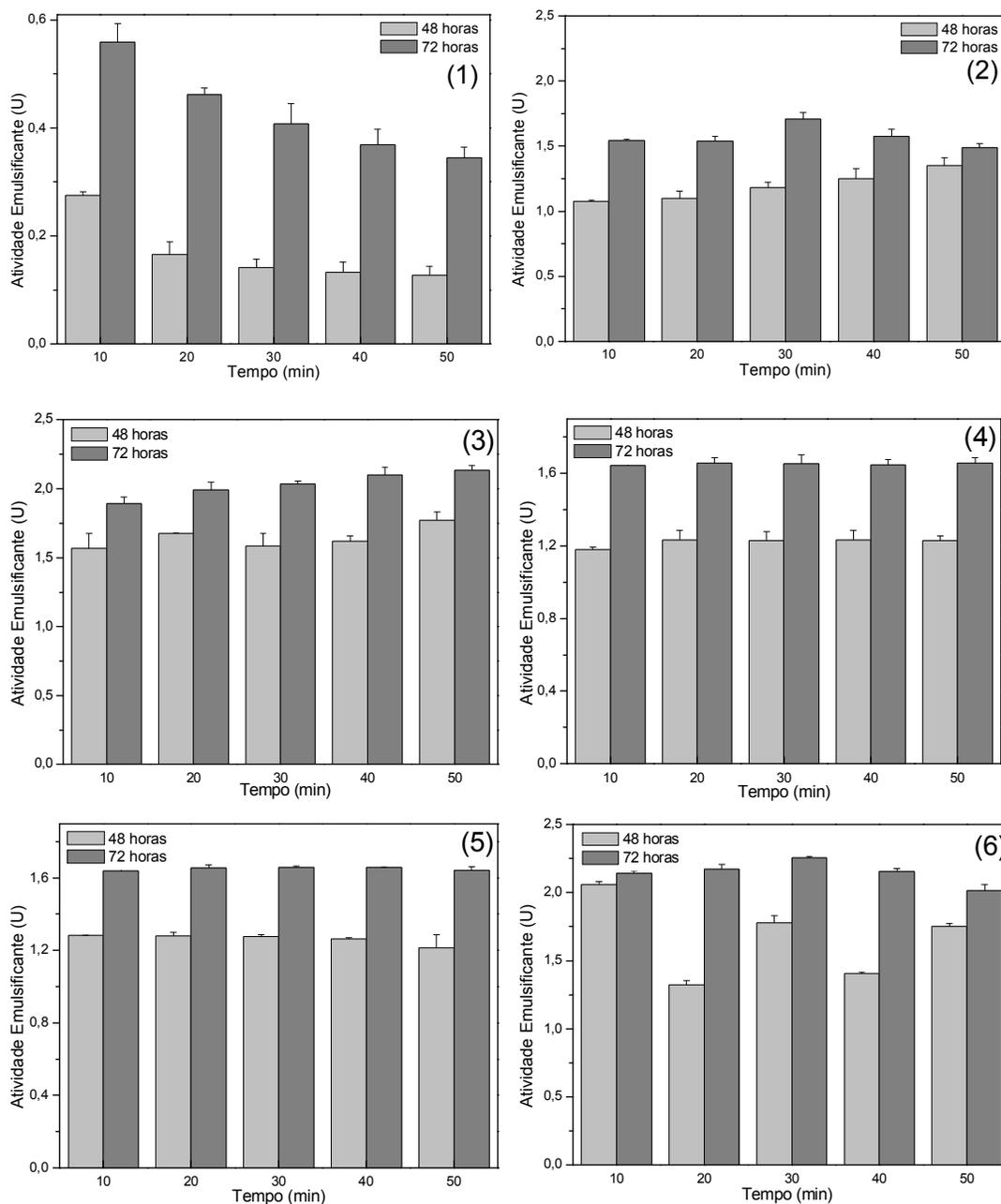


Figura 25 – Atividade emulsificante (U) da surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI005 em diferentes concentrações de ART em ensaios realizados em *shaker* a 30°C e 180 rpm, onde: Ensaio (1): 12,71 g.L⁻¹, Ensaio (2): 22,92 g.L⁻¹, Ensaio (3): 48,96 g.L⁻¹, Ensaio (4): 40,65 g.L⁻¹ + 0,1% de Solução de Micronutrientes, Ensaio (5): 65,04 g.L⁻¹, Ensaio (6): 96,10 g.L⁻¹.

Para o meio formulado com a concentração inicial de ART de 65,04 g.L⁻¹ observa-se que a atividade emulsificante mostrou-se estável em ambos os tempos de ensaio,

48 e 72 horas, mas não atingiu valores superiores ao ensaio com concentração inicial de 48,96 g.L⁻¹, onde a atividade emulsificante foi superior a dos demais ensaios e chegou a um valor ligeiramente maior que 2,0 U no tempo de 72 h. Amaral *et al.* (2006) obtiveram valor máximo de atividade emulsificante de, aproximadamente, 2 unidades com n-hexadecano em meio YPD após 50 horas de cultivo de *Yarrowia lipolytica* a 250 rpm. Cirigliano e Carman (1985), trabalhando com *Candida lipolytica* para produção do bioemulsificante Liposan, obtiveram uma atividade emulsificante com n-hexadecano de 0,98 U quando cultivada em meio YNB suplementado com 5% de óleo de soja. Neste trabalho, bons resultados foram obtidos na maioria dos ensaios apresentados, com valores de atividade emulsificante maiores a 1,5 U, chegando a valores próximos a 2,5 U.

4.7.2 – Tensão Superficial

A análise de tensão superficial foi utilizada para se avaliar a produção de biosurfactante, pois o mesmo diminui a tensão superficial do meio (Lima Lobato *et al.*, 2002; Nitschke *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002b, Rocha *et al.*, 2006). A habilidade em reduzir a tensão superficial abaixo de 35 mN.m⁻¹ é um dos critérios utilizados para a seleção de microrganismos produtores de biosurfactante (Mulligan *et al.*, 2005). A tensão superficial representa a tensão existente entre um líquido e o ar e o valor mínimo de tensão superficial é um indicativo da eficiência de um surfactante (Fiechter, 1992), além de ser, como já salientada, uma medida indireta da produção de tensoativos no meio de cultivo. Quanto maior a redução da tensão superficial do meio pressupõe-se uma maior presença de surfactante. Diversos fatores influenciam o tipo e a quantidade de surfactante, dentre os quais se destacam as condições de cultivo e a disponibilidade de nutrientes no meio (Syldatk *et al.*, 1985; Benincasa *et al.*, 2002).

No presente estudo, esses critérios acima descritos também foram utilizados para observar se o microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005 estava produzindo biosurfactante nas condições estudadas, e assim, definir qual a melhor condição dentre as testadas. Desta forma, foi realizada análise quanto à redução da tensão superficial para as diferentes concentrações de substrato, conforme apresentadas na Tabela 12. Todos os ensaios foram realizados em triplicata com análise da média das amostras.

Pela Tabela 14, pode-se verificar que ocorreu uma redução na tensão superficial ao longo do tempo para os ensaios realizados com suco de caju clarificado utilizando diferentes concentrações de fonte de carbono (12,71 a 96,10 g.L⁻¹). A redução da tensão superficial foi mais acentuada para todos os ensaios nas amostras do tempo de 24 h, com uma redução em torno de 33,7%, 49,7%, 45,4%, 41,7% e 41,2% para concentrações de ART iniciais de 12,71 g.L⁻¹, 22,92 g.L⁻¹, 48,96 g.L⁻¹, 65,04 g.L⁻¹, 96,10 g.L⁻¹ (suco não diluído), respectivamente e de 43,9% para concentrações iniciais de ART de 40,65 g.L⁻¹ + 0,1% de solução de micronutrientes). A menor tensão superficial obtida foi de 28,68 dina/cm, obtida quando se utilizou a concentração inicial de ART de 22,92 g.L⁻¹. Este também foi o ensaio em que obteve-se maior produção de surfactina (ver Tabela 10). Esse fator é um indício claro da produção de biossurfactante pelo microrganismo, uma vez que tensões superficiais abaixo de 35 dina/cm indicam que o microrganismo em questão é um bom produtor de surfactina e sua eficiência relaciona-se também a uma baixa CMC, Concentração Micelar Crítica (Mulligan *et al.*, 2005) definida como a concentração mínima necessária para iniciar a formação de micelas (Becher, 1965).

Observa-se ainda na Tabela 14, uma maior redução da tensão superficial a medida que se aumenta a concentração inicial de ART no meio, de 12,71 g.L⁻¹ até concentrações de 48,96 g.L⁻¹ e ocorre uma pequena redução nesse parâmetro para os meios cuja concentração inicial de ART é de 65,04 g.L⁻¹, 96,10 g.L⁻¹ (suco não diluído) e 40,65 g.L⁻¹ + 0,1% de solução de micronutrientes. Barros *et al.* (2008), que trabalharam com *Bacillus subtilis* LB5 cultivado em manipueira (resíduo da industrialização da mandioca) em um processo em escala piloto, relataram que o biossurfactante testado exibiu uma excelente atividade tensoativa, reduzindo a tensão da água de 72,31 para 27,01 dina/cm, valor este muito próximo ao obtido no presente trabalho (28,68 ± 1,0 dina/cm). Queiroga *et al.* (2003) utilizando *B. subtilis* para avaliação da tensão superficial na produção de biossurfactantes em presença de petróleo, observaram uma redução da tensão superficial de 53 dina/cm para 25,7 dina/cm. Gouveia *et al.* (2003), trabalhando com 13 linhagens de bactérias produtoras de biossurfactantes e utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono, obtiveram uma redução de tensão superficial do meio de 58 dina/cm para 30 dina/cm. Os resultados apresentados no presente estudo são bastante significativos quando comparados aos da literatura citada acima, pois se obteve redução da tensão do meio de cultivo de 52,0 dina/cm para até 28,7 dina/cm.

Tabela 14 – Resultados da Tensão Superficial (TS) para ensaios realizados em *shaker* a 30°C e 180 rpm, utilizando *B. subtilis* LAMI005 com diferentes concentrações de ART, onde: Ensaio (1): ART 12,71 g.L⁻¹; Ensaio (2): ART 22,92 g.L⁻¹; Ensaio (3): ART 48,96 g.L⁻¹; Ensaio (4): ART 40,65 g.L⁻¹ + micronutrientes; Ensaio (5): ART 65,04 g.L⁻¹; Ensaio (6): ART 96,10 g.L⁻¹; MC: meio de cultura antes do inóculo (branco); TS: Tensão Superficial.

Tempo (h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
	TS (dina/cm)	TS (dina/cm)	TS (dina/cm)
MC	52,28 ± 0,3	52,00 ± 0,2	56,33 ± 0,2
0	52,06 ± 0,1	53,72 ± 0,9	56,33 ± 0,2
8	48,54 ± 0,2	29,06 ± 0,1	30,00 ± 0,0
24	34,67 ± 0,0	28,68 ± 1,0	30,77 ± 0,5
48	42,94 ± 0,2	44,17 ± 0,9	42,45 ± 0,5
72	44,32 ± 0,2	43,31 ± 1,8	44,98 ± 0,0
Tempo (h)	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6
	RTS (dina/cm)	TS (dina/cm)	RTS (dina/cm)
0	55,08 ± 0,2	46,77 ± 1,4	50,79 ± 0,4
8	37,00 ± 0,0	42,76 ± 1,4	46,07 ± 0,0
24	33,33 ± 0,3	30,61 ± 0,5	30,00 ± 0,0
48	34,07 ± 0,2	31,49 ± 0,5	31,12 ± 0,1
72	33,50 ± 1,2	35,70 ± 0,3	31,67 ± 0,5
MC	59,39 ± 0,5	52,46 ± 0,6	51,02 ± 0,1

4.8 – Concentração Micelar Crítica (CMC)

A adição de tensoativos à água tende a saturar todas as interfaces, de modo que a partir de uma concentração denominada Concentração Micelar Crítica (CMC) tem-se a saturação do meio e a formação de micelas. A CMC é a menor concentração onde ocorre a formação de micelas de um biossurfactante. A micela é a configuração das moléculas de

tensoativo com melhor estabilidade na solução, com as cadeias hidrofóbicas agrupadas e a parte hidrofílica das moléculas voltada para a água (Santos *et al.*, 2007). A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes é uma das análises que detecta sua eficiência. Zhang e Miler, 1992, relataram que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a CMC está tipicamente entre 1 e 200 mg.L⁻¹, enquanto a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 dina/cm (Bognolo, 1999). A CMC do tensoativo produzido no presente estudo, a surfactina, foi determinada através de mudanças na Tensão Superficial, para várias concentrações do tensoativo, obtidas através de diluições sucessivas.

A Figura 26 apresenta os resultados de CMC obtidos no presente estudo com as diferentes concentrações de substrato utilizadas para produção de biossurfactantes. Foram utilizadas para realização dos testes de CMC as amostras dos meios fermentados ricos em surfactina em que houve maior formação de produto, conforme apresentado na Tabela 10. Pode-se observar que as concentrações da CMC obtidas nos ensaios fermentativos realizados ficaram entre 10 mg.L⁻¹ e 63 mg.L⁻¹. Peypoux *et al.* (1999) obteve CMC na concentração de 20 mg/L, Kim *et al.* (1997), 40 mg/L, e Cooper *et al.* (1981), 25 mg/L, indicando o surfactante produzido como um poderoso agente de superfície.

Cooper e Paddock (1983), ao trabalharem com *Bacillus subtilis* ATCC 21332, observaram baixa produção de surfactina quando a bactéria foi cultivada em caldo nutriente. Porém, quando o cultivo foi realizado em meio contendo glicose e sais minerais, foi obtido o valor da concentração micelar crítica relativa (CMC⁻¹) de 20 mM, correspondendo a um rendimento apreciável. O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio contendo surfactina de 62 dina/cm para 27 dina/cm. Robert *et al.* (1989), testando diferentes fontes de carbono, observaram a produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 somente na presença de dodecano. O crescimento da bactéria utilizando como substrato succinato, piruvato e citrato levaram a uma pequena formação de produto, embora este tenha propiciado queda substancial da tensão superficial do caldo fermentado. Os autores relatam que os melhores resultados foram obtidos utilizando óleo de oliva como substrato, onde a produção foi de 7,65 g.L⁻¹, CMC⁻¹ de 20 mM e tensão superficial de 28,4 dina/cm.

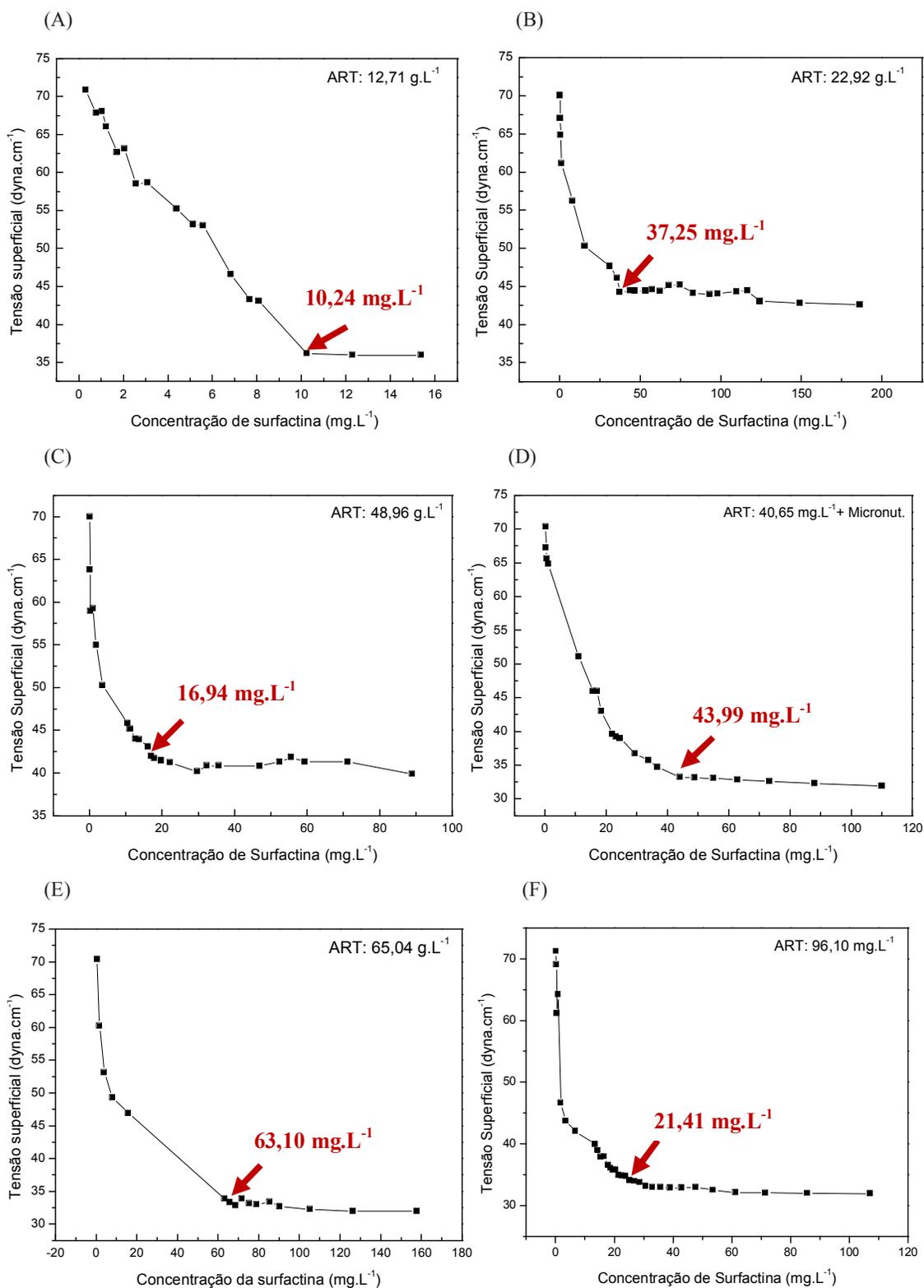


Figura 26 – Concentração Micelar Crítica (CMC) da surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI005 em diferentes concentrações de ART em ensaios realizados em *shaker* a 30 °C e 180 rpm: (A) 12,71 g.L⁻¹, (B) 22,92 g.L⁻¹, (C) 48,96 g.L⁻¹, (D) 40,65 g.L⁻¹ + 0,1% de Solução de Micronutrientes, (E) 65,04 g.L⁻¹, e (F) 96,10 g.L⁻¹.

Comparando os resultados aqui obtidos com a literatura citada, obteve-se no presente estudo um bom surfactante nos ensaios fermentativos variando a concentração de substrato, pois o mesmo foi capaz de manter a tensão superficial constante com baixas concentrações de surfactina.

5 – CONCLUSÕES

O biossurfactante produzido no meio de cultivo contendo suco de caju clarificado como fonte de carbono suplementado com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, foi capaz de reduzir a tensão superficial abaixo de 30 dina.cm^{-1} , emulsionou bem diversos hidrocarbonetos e apresentou emulsões estáveis.

Obtiveram-se valores de concentrações de surfactina satisfatórios quando comparados aos valores reportados na literatura, chegando a uma produção de até $372,56 \text{ mg.L}^{-1}$ de biossurfactantes.

De acordo com as velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de substrato (μ_s) e de produção de biossurfactante (μ_p), pode-se afirmar que a formação do produto é um metabólito primário e está associada ao crescimento.

O modelo matemático usado para descrever o consumo de substrato, obtenção do produto e crescimento celular se ajustou bem aos dados experimentais, comprovando a viabilidade da bioconversão do substrato em um produto de valor agregado, a surfactina.

Os ensaios fermentativos mostraram que *Bacillus subtilis* LAMI005 é um bom produtor de biossurfactante e que o suco de caju clarificado (CAJC) é um substrato economicamente viável para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005.

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após discussão dos resultados obtidos no presente estudo, percebe-se ainda a necessidade de aprofundar o tema estudado:

- Aumentar a escala de produção utilizando biorreator de bancada com controle de agitação, aeração, temperatura e pH;
- Estudar a estabilidade da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005 em suco de caju clarificado, frente a variações de temperatura, pH e concentrações salinas;
- Caracterizar o biossurfactante produzido;
- Analisar sua toxicidade;
- Direcionar testes para uma aplicação comercial onde o mesmo é utilizado.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and deviation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 4, p. 315-324, 1991.

AMARAL, P. F. F., SILVA, J. M., LEHOCK, M., BARROS-TIMMONS, A.M. V., COELHO, M. A.Z., MARRUCHO, I.M., COUTINHO, J.A.P., Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*, **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1894 – 1898, 2006.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil pollution remediation. A review. **Bioresource Technology, Essex**, v. 51, p. 1 - 12, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BARROS, F. F. C. **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira**. 106 p. Dissertação - (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – São Paulo, 2007.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, ed. 28, v. 4, p. 979-985, 2008.

BATISTA, S. B.; MOUNTER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, p.868-875, 2006.

BECHER, P. Emulsion. **Theory and Practice**. second ed. Reinhold Publising . New York. 1965.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source, **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.

BICCA, F. C., FLECK, L. C., AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia** 30:231-236, 1999.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, **Colloids and Surfaces A**, v. 52, p. 41 – 52, 1999.

Caju – custo de mercado. Disponível em: <http://www2.ceasa-ce.com.br/boletins.php?pagina=bdiario.htm>. Acessado em: 18 de novembro de 2009.

CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266, 2004.

CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5 , p. 520-529, 1998.

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 170, p. 569-574, 1995.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M., Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846-850, 1985.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor, Rio Grande**, v. 13, p. 85-103, 2003.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G.; MAEDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 42, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. G., PADDOCK, D.A. *Torulopsis petrophilium* and surface activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n.8, p.1426-1429, 1983.

COSTA, G. A. N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.** 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência

de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

COSTA, S. G. V. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C E VARLEY, J. The production of surfactin culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enz. Microb Technol**, v. 25: p. 322-329, 1999.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N. (Ed.) **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: CRC Press, p. 19-98, 1993.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distilley and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactants production. **World Journal Microb. Biot.**, 17, p.61-69, 2001.

DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M.; GOUVEIA, E. R. Produção de Rhamnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas de Petróleo. XIV Simpósio Nacional de Fermentações. SINAIFERM 2003. 5 a 8 de agosto 2003. Florianópolis. SC.

EICHLER, J. Biotechnological uses of archael extremozymes. **Biotechnology Advances**, v.19, p.261-278, 2001.

ENCINAS, J. P.; SANZ-GOMES, J.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GARCIA-ARMESTO, M. R.; OTERO, A. Evaluation of different systems for identification of *Bacillus* strains isolated from spanish fermented sausages. **Meat Science**, v.42, p.127-131, 1996.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application, **TIBTECH**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.

FERNANDES, P. L. **Produção de biosurfactantes por *Bacillus spp.* em condição anaeróbia**. 2007. 77 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

FERNANDES, A. C. L. B.; PEREIRA, M. D. ; KRONEMBERGER, F. A.; FREIRE, D. M. G. Produção de biossurfactantes para aplicação em remediação de solos contaminados por Petróleo: estudo dos fatores de virulência. In: **RIO OIL & GAS Expo and Conference, 2008**, Rio de Janeiro - Rio de Janeiro. RIO OIL & GAS Expo and Conference, 2008.

FONSECA, R. R.; SILVA, A.J.R.; FRANCA, F. P.; CARDOSO, V. L.; SERVULO, E. F. C. Optimizing Carbon/Nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, p. 471-485, 2007.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresour. Technol.**, v. 75, p. 235-240, 2000.

GARRUTI, D. S.; CASIMIRO, A. R. S.; ABREU, F. A. P. **Processo Agroindustrial: Elaboração de Fermentado de Caju**. Comunicado Técnico on line, 82, ISSN 1679-6535. Embrap, 2003.

GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnol. J.**, v. 4, p. 738–747, 2009.

GOUVEIA, E.R.; LIMA, D.P.A.; DUARTE, M.S.; SOUZA LIMA, G. M.; ARAUJO, J.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes. **Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 39-45, 2003.

HAFERBERG D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H.P. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Adv Biochem Engg**, v. 33: p. 53–93, 1986.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, n. 2, p. 148-159, 2001.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994.

HUE, N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.

ILORI, M.O.; AMUND, O.O. Production of a peptidoglycolipid bioemulsifier by *Pseudomonas aeruginosa* grown on hydrocarbon. **Z. Naturforsch.** 56C: p. 547-552, 2001.

IQBAL, S., KHALID, Z. M., MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactant by gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letter and Applied Microbiology**, v. 21, p. 176-179, 1995.

IVANOVA, E. P.; VYSOTSKII, M. V.; SVETASHEV, V. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; GORSHKOVA, N. M.; MIKHAILOV, V. V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUCHI, T.; YOSHIKAWA, S. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. **International Microbiology**, v.2, p. 267-271, 1999.

ISHIGAMI, Y.; SUZUKI, S. Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes, **Progress in Organic Coatings**, v. 31, p. 51 – 61, 1997.

ITO T., NAKASHIMADA Y., SENBA K., MATSUI T., NISHIO N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 100 , p. 260-265, 2005.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G. E VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, 77 (1): 116-126, 1999.

KAKINUMA, A.; OACHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGINO, H.; ISANO, M.; TUMURA, O.; ARIMA, K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, p. 669-672, 1969.

KIM,S.H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D. & LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L-417. **Biotechnol. Appl. Biochem.**,v. 31, 249-253. 2000.

KIM, H. S.; JEON, J. W.; KIM, B. H.; AHN, C. Y.; MOCK OH, H.; YOON, B. D.; **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 70, p. 391, 2006.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. p. 41-46, 1997.

KOSARIC, N., Biosurfactants in industry, **Pure & Applied Chemistry**, v. 64, n.11, p. 1731-1737, 1992.

KOSARIC, N., CAIRNS, W. L. *Biosurfactants and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, p. 21-46 e 47-88, 1987.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids--biosynthesis. microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.51, p. 22-32, 1999.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n 1-2, p. 12-20, 2002.

LIMA LOBATO, A. K. C.; MACEDO, G. R.; MAGALHÃES, M. M. A.; BEZERRA, M. S.; ALMEIDA, A. F.; COSTA, A. S. S. Estudo cinético da produção de biossurfactante. **Anais in CD-Rom of XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química**, Natal - RN, 2002.

LIMA, R. K. C. **Estudos de Composição e Estabilidade de Emulsões Preparadas a Base de Óleo Mineral Naftênico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará, 2004.

LIN, S. C.; CARSWELL, K. S.; SHARMA, M. M.; GEORGIU, G. Continuous Production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 281-285, 1994.

LIN, S. C.; J. Biosurfactants: recente advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 66, p. 109-120, 1996.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances Applied Microbiology**, v. 52. USA: Academic Press, cap. 4, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **J. Ind. Microbiol Biotechnol**, v. 18: p. 37 – 42, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production of biosurfactant at mesophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **J. Ind. Microbiol Biotechnol**, v. 20: p. 48 – 52, 1998.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 237-241, 1999.

MAKKAR, R.S. & CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, p. 428-434, 2002a.

MAKKAR, R.S e CAMEOTRA, S.S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant Production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 5, n. 1, 2002b.

MARTINS, J. J. L.; OLIVEIRA, D. W. F.; GIRO, M. E. A.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. Estudo Cinético da Produção de Biossurfactantes utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado em Suco de Caju. **Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, Natal, RN, p. 1-6, 2009.

MATSFUJI, M.; NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on etanol. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.19, n.12, p. 1213-1215, 1997.

MEDINA, J.C.; BLEINROTH, E.W.; BERNHARDT, L.W. **Instituto de Tecnologia de Alimentos. Frutas Tropicais**. Campinas: ITAL, 1978-1980. 10n.

MELO, C.S.; MAYORGA, R.D.; MAYORGA, I. O.; PAULA PESSOA, P.F.A. Subsídios à gestão empresarial na busca de competitividade: o caso do mel clarificado de caju. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 31, n. 4, p.1050-1058, 2000.

MERCADE, M. E., MANRESA, M. A., ROBERT, M., ESPUNY, M. J., ANDRES, C., GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME): new substrate for biosurfactant production. **Bioresour. Technol.**, v. 43, p. 1-6, 1993.

MORÁN, A. C.; MARTÍNEZ, A. M.; SIÑERIZ, F. Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 177–180, 2000.

MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 54, p. 479 – 489, 2005.

MULLIGAN, C. N. Enviromental aplications for biosurfactants. **Envirom. Pollution**, v .133 p.183-198, 2005.

MULLIGAN, C.N. & GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. **Biosurfactants, Production, Properties, Applications**. Marcel Dekker Kosaric, N. (Ed.), New York, p. 329–371, 1993.

MULLIGAN, C. N. **Enviromental aplications for biosurfactants**. *Envirom. Pollution*, v.133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. **Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review**. *Engineering Geology*, v. 60, p. 371, 2001.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Braz. J. Microbiol.** v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M., FERRAZ, C. PASTORE, G.M. Produção de biossurfactantes em manipueira. **Anais em CD-ROM do XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química**, Natal, 2002.

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.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais – Avaliação de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biossurfactantes por *Bacillus*. **Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento**, ed. 31, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

PALEJWALA, S.; DESAI, J. D. Production of extracellular emulsifier by a Gram negative bacterium. **Biotechnology**, v. 11, p. 115-118, 1989.

PATEL, R.M.; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.25, p. 91-94, 1997.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Rio Claro – São Paulo, 2006.

QUEIROGA, C.L.; NASCIMENTO, L.R.; SERRA, G. E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 1-10, 2003.

RAHMAN, K.S.M., RAHMAN, T.J., MCCLEAN, S., MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

Reagentes. Disponível em:

http://www.aprolab.com.br/category/1_reagentes/1_reagentes_2_pa. Acessado em: 18 de novembro de 2009.

REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C.; DE FRANÇA, F. P. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* grown on Low-Cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, p. 899-912, 2004.

ROBERT, M.; MERCADE, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. **Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1**. *Biotechnol. Lett.*, v. 11, p. 871-874, 1989.

ROCHA, M.V. P., GOMES; R. V., MELO; V. M. M., GONÇALVES, L. R. B. Avaliação de Diferentes Fontes de Carbono para a Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI007. **Anais do VI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, Curitiba, PR, p. 1-12, 2007.

ROCHA, M. V. R.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural Cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

ROCHA, M. V. P. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará, 124 f., 2007.

RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A., OLIVEIRA, R. Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142, 2006.

ROSEN, M.J. **Surfactants and interfacial phenomena**. John Wiley and Sons, New York, 1978.

RUFINO, R. D. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica***. 2006. Dissertação (Mestrado em Micologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – Pernambuco, 95f., 2006.

Safra de caju 2009:

ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola/%5Bmensal%5D/Fasciculo/2009/lspa_200910.zip, pág.: 35. Acessado em 12 de novembro de 2009.

SAMPAIO, R. M. **Estudo da produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação em óleo-diesel comercial**. Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, p. 370-375, 1990.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA JR. N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 459-467, 2002a.

SANTA ANNA, L.M., SEBASTIAN, G.V., MENEZES, E.P., ALVES, T.L.M., SANTOS, A.S. PEREIRA Jr., N., FREIRE, D.M.G. Production of Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 Isolated in Oil Environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n.2, p. 159-166, 2002b.

SANTA ANNA, L. M. M. **Produção de biossurfactante do tipo ramnolípido por *Pseudomonas* sp.** Dissertação - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; BARROS NETO, E. L. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. **In. Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás Natural**, v. 4, 9 p., Campinas, 2007.

SANTOS, L.G.; KAPPELI, O; FIECHTER. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n. 2, p. 301-305, 1984.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biocologia Industrial**, ed.1, v. 2, p. 539, 2001.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, n. 33, p. 163-184, 1995.

SHAHIDZADEH, N.; BONN, D.; MEUNIER, J.; NABAVI, M.; AIRIAU, M.; MORYAN, M. Dynamics of Spontaneous Emulsification for Fabrication of Oil in Water Emulsions, *Langmuir*. 16, p. 9703-9708, 2000.

SHEPPARD, O. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 29, p. 110-116, 1987.

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. **Z. Naturforsch**, v. 40c, p. 61-67, 1985.

SOUSA, J.R. **Produção de biossurfactantes a partir da glicerina obtida da produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará, 95f., 2008.

SOUZA SOBRINHO, H. B. **Utilização de resíduos industriais como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactantes por *Cândida sphaerica***. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais), Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 98 f., 2007.

SOUZA, M. N. **Experimentos de Físico-Química**, 2º ed., Curitiba: Neoprinte Ltda., p. 24-25, 1995.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 8ªed. Artmed, Porto Alegre, 894p, 2005.

Unidade piloto para produção de biossurfactantes:

<http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/revista-ch-2009/265/totalmente-biodegradavel> e http://www.faperj.br/boletim_interna.phtml?obj_id=5672. Acessado em 20 de maio de 2010.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evolution of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v. 57, p. 1139- 1150, 2004.

VOLLENBROICH, D; OZEL, M; VATER, J; KAMP, R. M; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, n. 25, p. 289-297, 1997.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 724-728, 1998.

WEI, Y. H.; CHU, I. M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 479-482, 2002.

WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 979-983, 2004.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WEI, Y-H.; WANG, L.; CHANG, J-S.; KUNG, S-S. Identification of Incuded Acidification in Iron – Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. Universidade de Yuan Ze, 2003.

YEH, M. S.; WEI, Y. H. CHANG, J.S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochem.**, v. 41, p. 1799-1805, 2006.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1329-1334, 2005.

YOUSSELF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detected biosurfactant production by diverse microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

ZHANG, Y.; MILLER, R. M.Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3276-3282, 1992.

ANEXO A

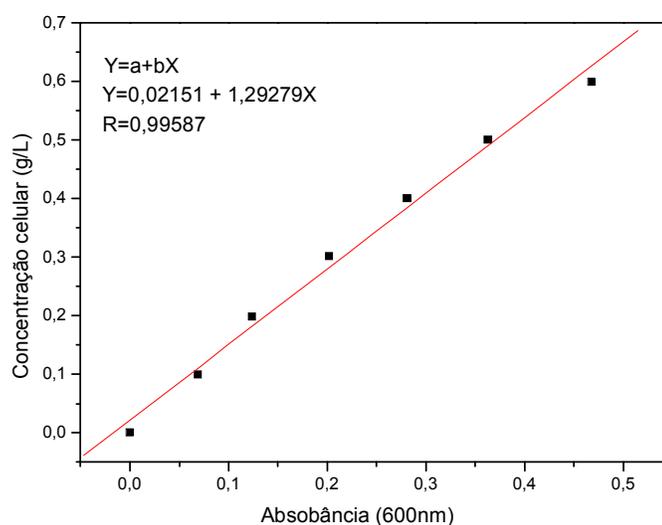
Curva padrão para concentração de Biomassa do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005.

Figura 1A – Curva padrão para identificação da concentração de biomassa do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005.

ANEXO B

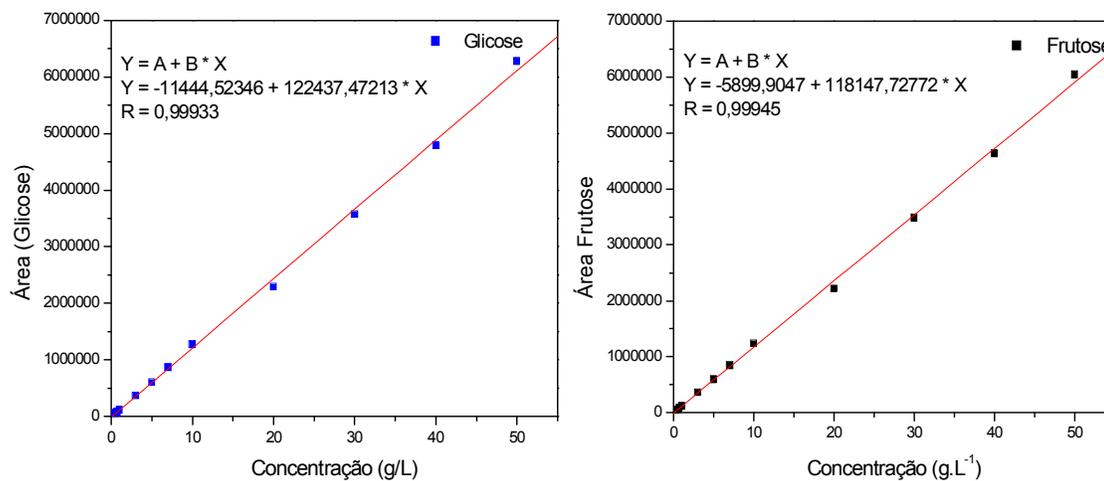
**Curva padrão para detecção da concentração de açúcares redutores totais (ART),
Glicose e Frutose.**

Figura 1B – Curva padrão de glicose e frutose para identificação das concentrações de ART durante os ensaios fermentativos para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado.

ANEXO C

Curva Padrão para identificação das concentrações de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado em suco de caju clarificado.

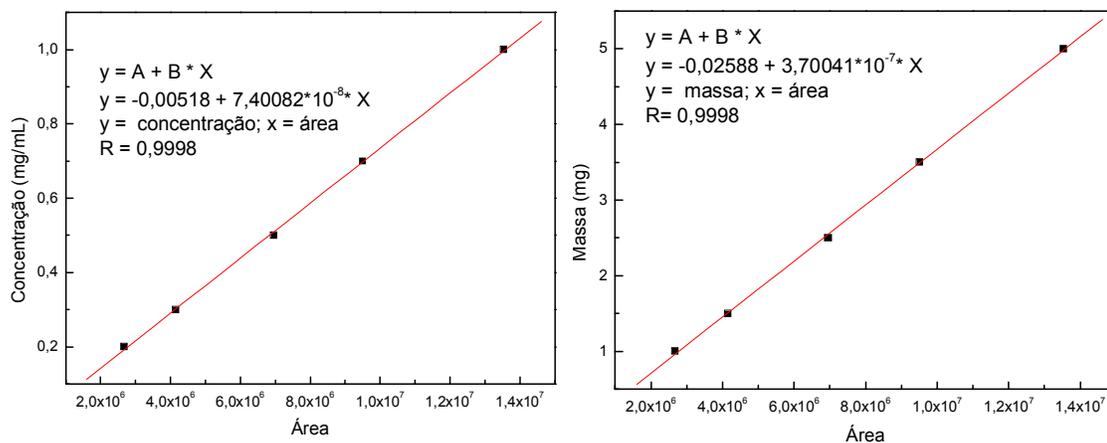


Figura 1C – Curva padrão para identificação da concentração e da massa obtida de surfactina nos ensaios fermentativos utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005 cultivado em suco de caju clarificado.

ANEXO D

Composição do suco de caju clarificado

Tabela D1 – Composição nutricional do suco de caju clarificado.

Parâmetro	Concentração
Glicose (g.L ⁻¹)	43,67 ± 0,3
Frutose (g.L ⁻¹)	2,43 ± 0,1
Proteínas solúveis (mg.mL ⁻¹)	0,10 ± 0,0
Proteínas Totais (mg.mL ⁻¹)	5,19 ± 0,0
Fósforo (g.L ⁻¹) ⁱ	1,21 ± 0,0
Potássio (g.L ⁻¹) ⁱ	13,13 ± 0,9
Cálcio (g.L ⁻¹) ⁱ	< DL
Magnésio (g.L ⁻¹) ⁱ	1,17 ± 0,1
Sódio (g.L ⁻¹) ⁱ	0,09 ± 0,0
Enxofre (g.L ⁻¹) ⁱ	0,81 ± 0,0
Cobre (mg.L ⁻¹) ⁱ	< DL
Ferro (mg.L ⁻¹) ⁱ	6,97 ± 2,7
Zinco (mg.L ⁻¹) ⁱ	11,20 ± 4,3
Manganês (mg.L ⁻¹) ⁱ	6,40 ± 0,4
pH = 4,32 ± 0,0	

(i) Análises realizadas no laboratório de Biotecnologia - DETAL/UFC. < DL: Menor do que o detectável. **Fonte:** Rocha, 2007.

Concentração de aminoácidos presentes no suco de caju clarificado utilizado como substrato para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005.

Tabela D2 - Aminoácidos presentes no suco de caju integral e clarificado.

Aminoácidos	Suco de Caju Integral Concentração ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	Suco de Caju Clarificado Concentração ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)
Ácido aspártico	128,94	104,04
Ácido glutâmico	181,45	146,55
Serina	172,42	147,90
Glicidina	224,34	187,60
Histidina	33,10	26,14
Treonina	371,47	355,83
Alanina	284,75	242,88
Prolina	152,13	138,41
Tirosina	81,76	73,43
Valina	27,94	30,66
Metionina	7,38	5,08
Cisteína	9,74	10,38
Isoleucina	39,00	41,15
Leucina	99,44	81,93
Fenilalanina	12,86	13,05
Lisina	13,09	11,78

Fonte: Rocha, 2007.