



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

DANIELA DINIZ EHRHARDT

CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO DO ABACAXI E SUA
UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES POR *BACILLUS SUBTILIS*

CAMPINAS

2019

DANIELA DINIZ EHRHARDT

“CARACTERIZAÇÃO DO RESÍDUO DO ABACAXI E
SUA UTILIZAÇÃO NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES POR *BACILLUS SUBTILIS*”

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Engenharia Química, da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof^o Dr. Elias Basile Tambourgi

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELA DINIZ EHRHARDT E
ORIENTADA PELO PROFESSOR DR. ELIAS BASILE TAMBOURGI.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

Eh86c Ehrhardt, Daniela Diniz, 1985-
Caracterização do resíduo do abacaxi e sua utilização no processo de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. / Daniela Diniz Ehrhardt. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biossurfactantes. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Abacaxi. 4. *Bacillus subtilis*. 5. Surfactina. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of pineapple residue and its use in the production process of biosurfactant by *Bacillus subtilis*.

Palavras-chave em inglês:

Biosurfactant

Agroindustrial residues

Pineapple

Bacillus subtilis

Surfactin

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Flávio Vasconcelos da Silva

Priscila Gava Mazzola

Elisângela de Jesus Cândido Moraes

Ana Paula Brescancini Rabelo

Data de defesa: 25-09-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <http://orcid.org/0000-0003-4829-4389>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1023905079271697>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por Daniela Diniz Ehrhardt aprovada em 25 de setembro de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi - (Orientador)

FEQ / UNICAMP

Prof. Dr. Flavio Vasconcelos da Silva

FEQ / UNICAMP

Dra. Elisângela de Jesus Cândido Moraes

Escola de Engenharia de Lorena – EEL/ USP

Dra. Priscila Gava Mazzola

FCF / UNICAMP

Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo

PUC – Minas – Poços de Caldas

ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido Bruno e aos meus pais João Paulo e Maria Aparecida, que me deram todo suporte e apoio para persistir em meus estudos. À minha filha Luísa, na esperança que ela tenha todas as oportunidades para estudar e atingir seus objetivos pessoais e profissionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelas oportunidades a mim concedidas, pela saúde e disposição para conseguir conciliar o início de minha vida como mãe, com as responsabilidades e afazeres do doutorado.

Ao meu marido, Bruno, que sempre me apoiou em minhas decisões e me deu o suporte necessário para seguir nessa jornada.

À minha mãe, Maria Aparecida, que me ajudou em tudo que precisei, me orientou, aconselhou e com toda sua ternura e amor, permitindo que essa caminhada fosse mais leve e tranqüila.

Ao meu pai, João Paulo, que com seu carinho sempre se preocupou e me apoiou durante esse período.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, que está ao lado há anos me ensinando e contribuindo para minhas conquistas na área acadêmica. Obrigada pela dedicação, paciência e por aceitar em me orientar mais uma vez.

Ao professor Edgar Silveira, que mesmo à distância não mediu esforços para me auxiliar.

Aos meus colegas do Laboratório de Processos de Separação II que, além de companheiros diários tornando o dia-a-dia de trabalho mais leve e prazeroso, sempre me apoiaram e se colocaram a disposição para me ajudar no que fosse preciso.

As professoras Dra. Aline de Carvalho da Costa e Maria Helena Andrade Santana, que permitiram a utilização de equipamentos de seus laboratórios para que eu pudesse concluir minhas análises.

As queridas amigas do Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos, Daniele e Thaynara, que além de companheiras em disciplinas, me ajudaram em diversos ensaios e me ensinaram muito ao longo desses anos.

Ao amigo Gilson, técnico do Laboratório de Desenvolvidos de Processos Biotecnológicos, que com alegria, paciência e disposição me acompanhou em muitos ensaios.

A todos os docentes, funcionários e demais colegas da Faculdade de Engenharia Química, sempre muito solícitos e gentis.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço ao CNPq, pela bolsa e taxa de bancada concedidas durante esses quatro anos permitindo a dedicação exclusiva ao projeto e desenvolvimento dos ensaios.

RESUMO

Durante os últimos anos uma grande variedade de microrganismos é estudada para a produção de biossurfactantes. A biodegradabilidade e a baixa toxicidade garantem a esses compostos uma vantagem quando comparados aos compostos sintéticos. Entretanto, os surfactantes naturais ainda são incapazes de competir economicamente no mercado, devido ao seu alto custo de produção. Sendo assim, o uso de fontes renováveis como substrato torna-se uma alternativa para minimizar os custos de produção e tornar esses produtos viáveis a utilização em diferentes áreas. O resíduo do abacaxi é uma válida opção para driblar o problema de alto custo. Além de ser uma das frutas mais produzidas no mundo, o abacaxi possui propriedades que favorecem o desenvolvimento de microrganismos e, conseqüentemente, a produção de biossurfactantes. O presente trabalho avaliou a viabilidade em utilizar o resíduo do abacaxi como substrato para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* através de estudos de caracterização do resíduo, aprimoramento do meio e análises de estabilidade, caracterização e aplicação do biossurfactante produzido. Os resultados da caracterização do resíduo do abacaxi reportaram excelentes quantidades de sacarose, frutose, glicose, proteína e lipídios, ideais para a produção de biossurfactante. Estudos para obtenção do meio ótimo foram realizados através de análises estatísticas com software *Statistica* (v.10). O meio otimizado, contendo 15% de inóculo e 95mL de resíduo de abacaxi, apresentou uma redução de 35,42% da tensão superficial. As análises de estabilidade mostraram que o biossurfactante produzido não é estável quando exposto à 121°C e apresenta estabilidade de cerca de 1 hora quando aplicado tratamento térmico a 100°C. Os resultados também não foram favoráveis em pH acima de 4 e concentrações salinas superiores à 5,0%. Os resultados de caracterização apontaram a produção de um biossurfactante de carácter aniônico e sua aplicação através da capacidade emulsificante mostrou-se promissora para utilização em indústrias alimentícias.

Palavras chave: Biossurfactantes, resíduos agroindustriais, abacaxi, *Bacillus subtilis*, Surfactina.

ABSTRACT

During the last years a great variety of microorganisms has been studied for the production of biosurfactants. Biodegradability and low toxicity ensure the inclusion of an advantage when compared to synthetic compounds. However, natural surfactants are still unable to compete economically in the market because of their high cost of production. Thus, the use of renewable sources as a substrate becomes an alternative to minimize production costs and make viable their use in several areas. The pineapple residue is a valid option to avoid the high cost problem. Besides being one of the most produced fruits in the world, pineapple has properties that favor the development of microorganisms and, consequently, the production of biosurfactants. The present work evaluated the feasibility of using the pineapple residue as a substrate for the production of biosurfactants by *Bacillus subtilis* with studies of residue's characterization, medium optimization and stability analysis, characterization and application of the biosurfactant produced. The results of the characterization of the pineapple residue reported several levels of sucrose, fructose, glucose, protein and lipids, ideal for the production of biosurfactant. The optimization of the environment was performed through statistical analysis with Statistica software (v.10). The optimized medium, containing 15% of inoculum and 95mL of pineapple residue, showed a reduction of 35.42% of surface tension. Stability analyzes showed that the biosurfactant produced is not stable when exposed to 121°C and presents stability of about 1 hour when applied heat treatment at 100°C. The results were also not favorable to pH above 4 and salines medium with concentration higher than 5.0%. The characterization results indicated a production of an anionic biosurfactant and its application through the emulsifying capacity was promising for use in food industries.

Key words: Biosurfactants, agroindustrial residues, pineapple, *Bacillus subtilis*, Surfactina.

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Faixas de Concentração dos padrões de açúcares quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência..... | 39 |
| Tabela 2. Composição dos cinco meios avaliados na Fermentação A – quantidade de resíduo de abacaxi e fontes de carbono e nitrogênio..... | 43 |
| Tabela 3. Composição do substrato utilizado na fermentação B – Meio com maior rendimento..... | 44 |
| Tabela 4. Concentrações das variáveis: concentração de inóculo, glicose e volume de resíduo de abacaxi, para realização do planejamento experimental 1..... | 44 |
| Tabela 5. Concentrações das variáveis: concentração de inóculo e volume de resíduo de abacaxi, para realização do planejamento experimental 2. | 44 |
| Tabela 6. Composição do melhor meio de fermentação para análises de estabilidade, purificação, caracterização e aplicação do biossurfactante - Processo fermentativo D. | 45 |
| Tabela 7. Condições de temperatura e tempo de exposição das amostras para teste de estabilidade térmica do biossurfactante produzido..... | 48 |
| Tabela 8. Massas das amostras obtidas na análise de quantificação de lipídios presentes no resíduo de abacaxi. | 54 |
| Tabela 9. Resultados das leituras de pH dos extratos de resíduos de abacaxi..... | 55 |
| Tabela 10. Avaliação da produção de biossurfactante através da tensão superficial após fermentação de 24 horas com cinco diferentes meios como substrato..... | 57 |
| Tabela 11. Avaliação da Produção de Biossurfactante através do Índice de Emulsão, de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, em cinco diferentes meios testados. | 59 |
| Tabela 12. Resultados para massa seca e colapso da gota para os cinco meios analisados. | 60 |
| Tabela 13. Composição do meio ótimo e condições de fermentação para análises de tensão superficial, testes de estabilidade e aplicação do biossurfactante. | 69 |
| Tabela 14. Valores de tensão superficial da amostra em tempo zero e após 24 horas de fermentação. | 71 |

Tabela 15. Avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido, através da análise de tensão superficial, após adição de soluções com pH na faixa de 4.0 a 8.0..... 74

Tabela 16. Atividade emulsificante do biossurfactante produzido avaliando quatro diferentes hidrocarbonetos. 76

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Tensão superficial, interfacial e solubilização em função da concentração de surfactante. (Fonte: Almeida, 2015)..... | 24 |
| Figura 2. Crescimento da Produção Mundial de Abacaxi (em toneladas) durante os anos de 2006 a 2018. (Fonte: FAOSTAT 2019). | 30 |
| Figura 3. Valores Médios da Quantidade Anual de Abacaxi Produzida nos Países de Maior Produção do Fruto (Fonte: FAOSTAT 2019). | 31 |
| Figura 4. Maiores Produtores Mundiais de Abacaxi - Soma da Produção entre os anos de 2007 a 2017 (Fonte: FAOSTAT 2019)..... | 31 |
| Figura 5. Estruturas de surfactantes sintéticos A. Dodecil sulfato de sódio (aniônico); B. Cloreto de dodecilamônio (catiônico); C. N-dodecil-N, N-dimetilbetaína (anfótero). (Fonte: Barbosa, 2004)..... | 50 |
| Figura 6. Curva para Quantificação de Frutose obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). | 52 |
| Figura 7. Curva para Quantificação de Glicose obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). | 52 |
| Figura 8. Curva para quantificação de Sacarose obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). | 53 |
| Figura 9. Média da Redução da Tensão Superficial como Índice de Avaliação da Produção de Biossurfactantes nos substratos testados. | 57 |
| Figura 10. Efeitos estimados obtidos no Planejamento Experimental 1, (Fonte: produzido pela autora utilizando software Statistica v.10) | 62 |
| Figura 11. Pareto dos Efeitos com limiar de significância de 0,05 obtido no planejamento experimental 1 (Fonte: produzido pela autora utilizando software Statistica v.10) | 62 |
| Figura 12. Superfície de Resposta - Concentração Glicose x Concentração Inóculo – obtida no planejamento experimental 1..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Superfície de Resposta - Concentração Glicose x Concentração Inóculo – obtida no planejamento experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 63 |
| Figura 13. Curvas de Nível - Concentração Glicose X Concentração de Inóculo – obtidas no Planejamento Experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 63 |
| Figura 14. Superfície de Resposta Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 64 |
| Figura 15. Curvas de Nível - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo – obtidas no Planejamento Experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 64 |
| Figura 16. Superfície de Resposta - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Glicose – obtida no planejamento experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 65 |
| Figura 17. Curvas de Nível - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Glicose – obtidas no planejamento experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 65 |
| Figura 18. Efeitos estimados - Planejamento Experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 66 |
| Figura 19. Pareto dos Efeitos com limiar de significância de 0,05, obtido no planejamento experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 66 |
| Figura 20. Superfície de Resposta - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo – obtida no planejamento experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 67 |
| Figura 21. Curvas de Nível - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo – obtidas no planejamento experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10). | 67 |
| Figura 22. Avaliação da Produção de Biossurfactante através da Redução da Tensão Superficial – Análise ponto a ponto, por 24 horas. | 69 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Avaliação da Estabilidade através da Análise de Tensão Superficial após exposição, a uma temperatura de 100°C, do biossurfactante produzido. | 72 |
| Figura 24. Avaliação da Estabilidade através da Análise de Tensão Superficial após exposição, a uma temperatura de 121°C, do biossurfactante produzido. | 73 |
| Figura 25. Avaliação da Estabilidade do Biossurfactante produzido através da análise de Tensão Superficial após adição de solução de NaCl em diferentes concentrações. | 75 |
| Figura 26. Atividade emulsificante do biossurfactante produzido, avaliando quatro hidrocarbonetos. | 77 |

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

| | |
|--|----|
| Equação 1. Cálculo da Porcentagem de Lipídios Totais baseado na metodologia de Bligh-Dayer (1959)..... | 40 |
| Equação 2. Cálculo do Índice de Emulsão de acordo com Cooper e Goldenberg (1987)..... | 46 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 | Objetivos..... | 22 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral | 22 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 22 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 23 |
| 2.1 | Biossurfactantes | 23 |
| 2.1.1 | Propriedades e Funções | 23 |
| 2.1.2 | Biossíntese | 24 |
| 2.2 | Produção e Purificação de Biossurfactantes | 25 |
| 2.2.1 | Meios de cultivo | 25 |
| 2.2.2 | Fermentação..... | 26 |
| 2.2.3 | Purificação | 27 |
| 2.3 | Fontes Convencionais para a Produção de Biossurfactantes | 28 |
| 2.3.1 | Carbono e Nitrogênio | 28 |
| 2.3.2 | Resíduos Agro-Industriais como Substratos | 29 |
| 2.3.3 | Uso de Resíduos do Abacaxi..... | 29 |
| 2.3.4 | Resíduos de Óleos | 33 |
| 2.4 | Economia | 33 |
| 2.4.1 | Uso de fontes renováveis como substrato..... | 33 |
| 2.5 | Aplicações..... | 34 |
| 2.5.1 | Biorremediação..... | 35 |
| 2.5.2 | Indústria de Alimentos | 36 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.5.3 | MEOR..... | 37 |
| 2.5.4 | Farmacêutico | 38 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 3.1 | Caracterização do Abacaxi | 39 |
| 3.1.1 | Concentração de Açúcares..... | 39 |
| 3.1.2 | Quantificação de Proteína..... | 40 |
| 3.1.3 | Quantificação de Lipídeos | 40 |
| 3.1.4 | pH | 41 |
| 3.2 | Produção de Biossurfactante..... | 41 |
| 3.2.1 | Microrganismo | 41 |
| 3.2.2 | Pré-Inóculo e Inóculo | 41 |
| 3.2.3 | Processo de Fermentação..... | 42 |
| 3.3 | Análises da Efetividade de Produção..... | 46 |
| 3.3.1 | Tensão Superficial | 46 |
| 3.3.2 | Índice de Emulsão (E_{24})..... | 46 |
| 3.3.3 | Biomassa..... | 46 |
| 3.3.4 | Colapso da Gota | 47 |
| 3.4 | Planejamentos Experimentais | 47 |
| 3.5 | Testes Estabilidade | 47 |
| 3.5.1 | Estabilidade Térmica | 48 |
| 3.5.2 | Estabilidade frente a mudanças de pH..... | 49 |
| 3.5.3 | Estabilidade frente à força iônica | 49 |
| 3.6 | Purificação e Caracterização Iônica..... | 49 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.6.1 | Purificação | 49 |
| 3.6.2 | Caracterização Iônica | 50 |
| 3.7 | Aplicação | 50 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 4.1 | Caracterização do Abacaxi | 51 |
| 4.1.1 | Concentração de açúcares..... | 51 |
| 4.1.2 | Quantificação de proteínas | 53 |
| 4.1.3 | Quantificação de Lipídios..... | 54 |
| 4.1.4 | pH..... | 55 |
| 4.2 | Processo Fermentativo A..... | 56 |
| 4.2.1 | Tensão Superficial | 56 |
| 4.2.2 | Índice de Emulsão | 58 |
| 4.2.3 | Biomassa e Colapso da Gota | 60 |
| 4.3 | Processo Fermentativo B | 61 |
| 4.3.1 | Planejamento Experimental I..... | 61 |
| 4.4 | Processo Fermentativo C | 65 |
| 4.4.1 | Planejamento Experimental II | 65 |
| 4.5 | Processo Fermentativo D | 68 |
| 4.5.1 | Tensão Superficial – ponto a ponto | 68 |
| 4.5.2 | Teste de Estabilidade | 70 |
| 4.5.3 | Caracterização Iônica | 75 |
| 4.5.4 | Aplicação | 76 |
| 5 | CONCLUSÃO | 79 |

| | | |
|---|-------------------------------------|----|
| 6 | SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS..... | 80 |
| 7 | REFERÊNCIAS..... | 81 |

1 INTRODUÇÃO

Biossurfactantes, assim como os surfactantes químicos, são compostos anfífilicos que possuem duas porções, uma hidrofílica e outra hidrofóbica, que permitem sua ação na interface de líquidos imiscíveis (Varjani e Upasani, 2017). São produzidos, principalmente, por microrganismos aeróbicos sejam eles bactérias, fungos ou leveduras. Possuem ampla utilização na produção de detergentes, produtos de limpeza em geral, herbicidas, além de serem utilizados nas indústrias de petróleo, indústrias têxteis, alimentícias, farmacêuticas e cosméticas (Secato *et al.*, 2017).

Por serem moléculas anfipáticas, os biossurfactantes reduzem a tensão superficial e interfacial auxiliando a mistura de duas fases de polaridades distintas. Além de tal característica tais compostos são menos tóxicos, biodegradáveis, melhores produtores de espuma e mais estáveis quando expostos a condições ambientais extremas, quando comparados com os surfactantes sintéticos, tornando-os alternativas promissoras em diversas áreas industriais (Al-Bahry *et al.*, 2012).

Atualmente, os surfactantes naturais não são capazes de competir do ponto de vista econômico com os sintéticos devido aos altos custos de produção, consequência de metodologias de produção e purificação ineficientes, baixa produtividade microbiana e, principalmente, o uso de substratos de custo elevado (Santos, 2015). Estima-se que 30% do custo total de produção dos biossurfactantes representem o valor gasto com substratos químicos (Muthusamy *et al.*, 2008).

Tendo em vista o fator econômico como limitante para a produção dos surfactantes naturais, mas levando-se em consideração as propriedades apresentadas por esses compostos, aliadas às vantagens de serem moléculas de baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Faria, 2010), a utilização de substratos renováveis torna-se uma interessante alternativa para reduzir os custos de produção e tornar os biossurfactantes mais competitivos para utilização em escala industrial (Barros *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, estudos são conduzidos a fim de se obter um maior rendimento na produção de biossurfactantes fazendo uso de substratos renováveis. A possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais vem sendo largamente aplicada em pesquisas, trazendo resultados promissores no desenvolvimento de novas técnicas (Ehrhardt, 2015).

Resíduos agroindustriais não são comumente utilizados no desenvolvimento de produtos de alta qualidade. Entretanto, o sucesso na produção de biossurfactantes depende, em grande parte, da utilização de matérias-primas de baixo custo com elevado teor de carbono e nutrientes (Gurjar e Sengupta, 2015).

O abacaxi (*Ananas comosus L.*) é uma fruta das regiões tropicais e subtropicais, consumido em todo mundo, tanto na forma de produtos industrializados, quanto ao natural (Abílio *et al.*, 2009). Ainda que nativo da América do Sul, o abacaxi é cultivado em diferentes regiões no mundo todo, devido sua capacidade de adaptação, facilidade de propagação e resistência a climas secos (Rodríguez *et al.*, 2013).

De acordo com dados da FAO (2019), o Brasil encontra-se em terceiro lugar na produção mundial de abacaxi, ultrapassando 2.000.000 toneladas/ano. Considerando a soma da produção entre os anos de 2007 a 2017, o Brasil fica em primeiro lugar, com uma produção maior que 27.000.000 toneladas durante esse período.

Atualmente, o foco principal da indústria de abacaxi está voltado para a parte comestível do fruto e produtos alimentícios relacionados e, conseqüentemente, as outras partes da planta (talo, coroa e casca) são consideradas resíduos agroindustriais do cultivo de abacaxi (Santos *et al.*, 2013). Desta forma, é possível prever o grande montante de resíduo gerado, que pode ser aproveitado para fins biotecnológicos, como na produção de biossurfactantes.

As propriedades do abacaxi, como alto teor de açúcar, lipídios, proteínas, ferro e fósforo, favorecem o desenvolvimento de microrganismos e, conseqüentemente, auxiliam na produção de biossurfactantes. Tais componentes também influenciam na quantidade e qualidade do composto produzido.

A classificação dos biossurfactantes é dada de acordo com sua composição química e sua origem microbiana. Dentre as classes, é possível citar os glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, ácidos graxos e fosfolipídios, surfactantes particulados e poliméricos (Nitschke e Pastore, 2002). Cada microrganismo em uma diferente condição de fermentação é capaz de produzir um surfactante diferente, em quantidades diferentes e com capacidade de rendimento diferente. Essa diversidade permite sua aplicação em diversas áreas, cabendo às indústrias avaliarem qual biossurfactante é o mais adequado dentro de sua área de atuação.

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete capaz de secretar enzimas para degradar uma variedade de substratos, possibilitando sua sobrevivência em ambientes em constante mutação (Westers *et al.*, 2004). É conhecida por produzir biossurfactantes potentes da classe dos lipopeptídios, como a surfactina, utilizando diferentes matérias-primas (Al-Wahaibi *et al.*, 2014). A surfactina é reconhecida como um dos surfactantes naturais de maior eficácia, porém ainda com limitações de uso e aplicação devido ao alto valor agregado a sua produção e baixos rendimentos (Yeh *et al.*, 2006).

À vista disto, o desenvolvimento de novas técnicas de produção e utilização de novos substratos de baixo custo são estratégias para obtenção de altos rendimentos da surfactina e demandam urgência em sua pesquisa e execução.

Muitos são os estudos voltados à produção de biossurfactante com a utilização de substratos comerciais, o que resultam em grandes rendimentos, porém com custos elevados, não justificando a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais.

O presente trabalho contribui com os estudos de produção de biossurfactantes com custos reduzidos fazendo uso de casca de abacaxi como substrato e avaliando as melhores condições para se trabalhar com este resíduo agro-industrial de forma a se obter melhores rendimentos de produção. O abacaxi é um fruto de alta produção do Brasil cujas cascas são desperdiçadas. A riqueza nutricional desse resíduo é praticamente inexplorada e não há estudos voltados a sua aplicação em produção de surfactantes naturais. Desta forma, a presente pesquisa busca unir o aproveitamento de um bem natural brasileiro em abundância com a necessidade de melhoria econômica e ambiental na obtenção de biossurfactantes.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades do resíduo do abacaxi a fim de encontrar a melhor condição para sua utilização na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os açúcares presentes no resíduo do abacaxi;

- Avaliar a quantidade de rejeito processado necessário para suprir a os microrganismos energeticamente na produção de biossurfactantes;
- Realizar planejamento experimental a fim de avaliar as diferentes condições de fermentação;
- Avaliar a melhor condição de fermentação para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*;
- Realizar testes de estabilidade do biossurfactante produzido;
- Purificar e caracterizar o surfactante natural obtido;
- Avaliar uma possível aplicabilidade para o biossurfactante produzido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossurfactantes

2.1.1 Propriedades e Funções

Assim como os surfactantes sintéticos, biossurfactantes são compostos que contém duas porções, uma hidrofóbica e outra hidrofílica (Santos *et al.*, 2015). Essa característica os permite atuar na redução da tensão superficial e interfacial entre duas moléculas imiscíveis, conforme ilustrado na figura 1.

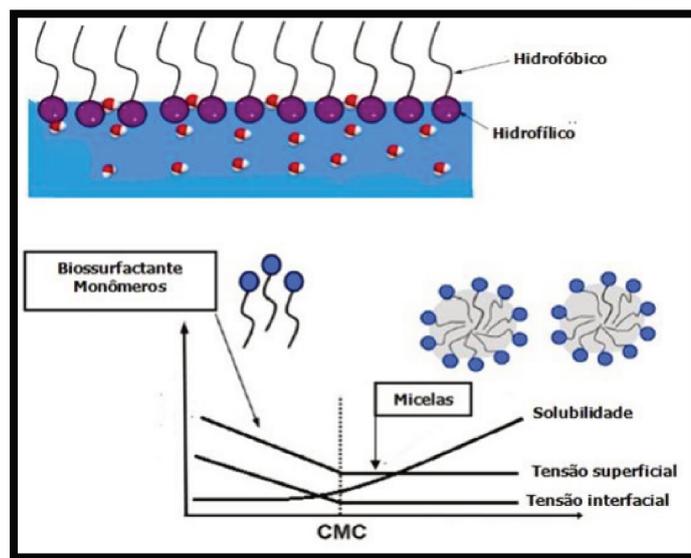
Biossurfactantes são produzidos por variados microrganismos, como leveduras, fungos e bactérias e, na última década, houve um aumento da demanda de compostos com ação superficial de origem natural, intensificando os estudos dessas moléculas. Uma das mais importantes características desses surfactantes naturais é que cada microrganismo, em diferentes condições de cultura e fermentação, podem produzir diferentes compostos, com diferentes estruturas químicas e, conseqüentemente, com diferentes propriedades surfactantes (Parveen *et al.*, 2014).

Entre as principais propriedades dos tensoativos é possível citar as mais importantes como adsorção, concentração micelar crítica, solubilização de substâncias hidrofóbicas e microemulsionantes e balanço hidrofílico / lipofílico (Sousa, 2016).

Tais propriedades, como detergência, poder de emulsificação, lubrificação, capacidade de formação de espuma, dispersão de fase e solubilização, tornam os surfactantes interessantes para uma gama de aplicações industriais (Nitschke e Pastore, 2002).

De acordo com Cooper e Paddock (1984), os surfactantes naturais são mais eficientes do que os sintéticos no que diz respeito a suas atividades superficial e interfacial, uma vez que produzem uma menor tensão superficial utilizando menores concentrações de biossurfactantes.

Figura 1. Tensão superficial, interfacial e solubilização em função da concentração de surfactante. (Fonte: Almeida, 2015).



Apesar da grande diversidade de biossurfactantes que podem ser produzidos, todos possuem em comum características que os tornam vantajosos em relação aos surfactantes sintéticos. Além da atividade interfacial e superficial já descrita anteriormente, esses compostos apresentam tolerância à temperatura, pH e forças iônicas, e também são caracterizados pela baixa toxicidade, biodegradabilidade e pela possibilidade de serem produzidos por fontes renováveis. (Nitschke e Pastore, 2002).

2.1.2 Biossíntese

A síntese de biossurfactantes ocorre, especialmente, durante o processo de crescimento microbiológico em substratos imiscíveis em água (Castiglioni *et al.*, 2009). Embora existam muitas pesquisas voltadas a sínteses por microrganismos que degradam hidrocarbonetos, alguns biossurfactantes podem ser obtidos por compostos hidrossolúveis (Kronemberger, 2007). O processo de produção de surfactantes naturais está associado a diversos fatores, que irão determinar a quantidade e qualidade do composto produzido.

Mudanças nas condições fisiológicas e composição do meio de cultura são alternativas promissoras para aumentar a produtividade dos biossurfactantes e são os pontos de pesquisa mais frequentemente estudados nos últimos anos (Castiglioni *et al.*, 2009).

De acordo com Desai e Banat (1997) há quatro tipos de parâmetros cinéticos da produção de biossurfactantes: produção associada ao crescimento; produção sob limitações de crescimento; produção por células em repouso ou imobilizadas; produção com suplementação de precursores.

2.2 Produção e Purificação de Biossurfactantes

2.2.1 Meios de cultivo

Há diversos métodos envolvidos na produção de biossurfactantes, começando com uma vasta variedade de metodologias aplicadas para selecionar microrganismos produtores. Tais métodos, que podem ser quantitativos ou qualitativos, estão na maioria das vezes, baseados nas propriedades físico-químicas dos surfactantes, especialmente em sua atividade superficial (Faria, 2010).

O meio de cultura é de grande importância para definir se o microrganismo é ou não capaz de produzir o biossurfactante, além de interferir em sua estrutura biomolecular (Sousa, 2016).

A produção de surfactantes é, geralmente, em um meio de cultura apropriado e aderida às paredes celulares. A pesquisa e escolha por microrganismos produtores está relacionada com o potencial do composto em reduzir a tensão superficial, bem como sua capacidade em formar emulsões e sua estabilidade, e tais habilidades são fatores consideráveis para a escolha do microrganismo a ser utilizado e caminho a ser seguido pelas indústrias (Pinto *et al.*, 2009).

É de grande valia e importância, a realização de estudos preliminares das condições de meios de cultura para o microrganismo a ser utilizado, definindo as melhores condições a fim de se obter a máxima produção (Sousa, 2015).

A qualidade e quantidade de biossurfactante produzido está diretamente relacionada com a natureza das fontes de carbono e nitrogênio oferecidas aos microrganismos produtores, bem como as condições de fermentação como temperatura, pH, agitação, oxigenação e concentração de nutrientes como fósforo, ferro e magnésio (Lin, 1996).

A efetividade da produção dos tensoativos naturais pode ser avaliada por sua capacidade em reduzir a tensão superficial. Biossurfactantes são compostos ativos de superfície, com uma variedade de propriedades físico-químicas que incluem, em adição a sua capacidade de redução da tensão superficial e interfacial, baixos valores de concentração micelar crítica (CMC) e alta capacidade emulsificante (Faria, 2010).

A constatação da efetividade do biossurfactante produzido, pode também ser observada através da sua habilidade em emulsificar misturas de hidrocarbonetos em água, através de um significativo aumento da degradação desses hidrocarbonetos (Castiglioni et al., 2009), bem como através de sua atividade em estabilizar ou desestabilizar emulsões (Kronemberger, 2007).

2.2.2 Fermentação

Diversos produtos são obtidos através de processos de fermentação, como enzimas, aminoácidos, biopolímeros, antibióticos e vitaminas. Basicamente, a fermentação consiste na utilização de fontes de carbono para gerar energia e algum outro produto (Barbieri *et al.*, 2012).

São dois os fatores que influenciam significativamente na produção e atividade de biossurfactantes: as propriedades do substrato e o tipo e condições de fermentação.

As condições impostas no processo fermentativo como temperatura, pH, agitação, fontes de carbono e nitrogênio, irão influenciar nas características do biossurfactante produzido e essas condições variam de acordo com o microrganismo e substrato de escolha.

Fermentação em estado sólido (SSF) Solid state fermentation (SSF) é um sistema adequado para uso de resíduos agroindustriais e substratos de baixo custo. Velioglu and Urek (2015) avaliaram a produção de biossurfactantes por *Pleurotus djamor* em SSF e pesquisaram sobre o efeito do tamanho e quantidade do substrato sólido, volume do meio, temperatura, pH e Fe^{2+} com diferentes resíduos agro industriais como substrato, afim de otimizar a produção de biossurfactantes.

Fahram *et al.* (2016) produziram biossurfactantes por *Bacillus sp.* Utilizando fermentação submersa (SMF) com 1% de diferentes fontes de carbono, 1% de óleo de cozinha suplementado com meio BH e fixaram condições de pH, temperatura e agitação. Os

resultados mostraram que o biossurfactante produzido nessas condições apresenta um bom potencial para uso em indústrias de alimentos.

A utilização do correto meio de cultura combinada com as condições ideais de fermentação são importantes para melhorar o processo e obter a máxima performance com baixo custo, tornando o uso do biossurfactante mais favorável e economicamente viável quando comparado com os surfactantes sintéticos.

2.2.3 Purificação

Após a obtenção do biossurfactante através do processo de fermentação, é possível realizar a purificação. Diferentes técnicas de purificação podem ser empregadas de acordo com o tipo de biossurfactante produzido e a sua proposta de utilização. Em geral, o processo de purificação é importante para caracterizar o biossurfactante e, assim, poder avaliar, de acordo com a sua estrutura, as possibilidades de utilização do mesmo.

Liu *et al.* (2016) estudou a purificação de biossurfactante utilizando o surfactante bruto produzido por *Bacillus licheniformis*. O produto bruto foi isolado adicionando HCl ao sobrenadante e o precipitado obtido foi dissolvido em uma solução diluída de NaOH com pH 7. Depois disso, foi realizada a liofilização e o produto bruto extraído com auxílio de diclorometano. O solvente foi removido sob pressão reduzida e obteve-se um sólido amarelo pálido e realizada a recristalização.

Outro estudo mostrou que a purificação do biossurfactante produzido por *Aneurinibacillus aneurinilycitus* pode ser realizada extraindo o biossurfactante pré-tratado com acetato etílico, concentrando e secando a fase orgânica com o auxílio de um rota evaporador e então, purificando através de cromatografia (Balan *et al.*, 2017).

Outro método de purificação que pode ser utilizado baseia-se na separação de fases com a adição de solução de clorofórmio e metanol. Depois disso, a fase orgânica é concentrada utilizando rota evaporador e então, o produto final é diluído com metanol e concentrado novamente com o auxílio de estufa a 45°C (Silva *et al.*, 2010).

2.3 Fontes Convencionais para a Produção de Biossurfactantes

2.3.1 Carbono e Nitrogênio

Como anteriormente descrito, a qualidade e quantidade do biossurfactante produzido depende das condições de fermentação como pH, temperatura, agitação e oxigenação. As propriedades, o tipo e quantidade desses compostos vão depender também do microrganismo utilizado e de fontes de carbono e nitrogênio disponíveis no meio.

Pereira *et al.* (2013) avaliou diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. A variedade de fontes de carbono estudadas incluiu frutose, glicose, glicerol, n-hexadecano, lactose, parafina, sacarose, extrato de carne e triptona. Enquanto as fontes de nitrogênio avaliadas foram citrato de amônio, nitrato de amônio, sulfato de amônio e uréia. A condição ótima para produção foi obtida com a combinação de sacarose e nitrato de amônio, alcançando a concentração de 2.2g/L, uma tensão superficial de 28 mN/m e um índice de emulsificação de 39%.

Entretanto, outro estudo com *Bacillus subtilis* obteve bons resultados utilizando sacarose e nitrato de potássio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Tal estudo também mostrou que a adição de cálcio, ferro e magnésio no meio de cultura resulta em um aumento na produção de biossurfactante (Makkar e Cameotra, 2002).

Estudos voltados à produção de ramnolipídios apresentaram rendimento máximo com a limitação de fontes de nitrogênio com relação carbono/nitrogênio entre 16:1 a 18:1 e ausência de produção sem limitação de nitrogênio – relação C/N 11:1 (Guerras – Santos *et al.*, 1986).

Saikia *et al.* (2012) estudou a produção de surfactante natural por *Pseudomonas aeruginosa* e constatou que o uso de glicerol e nitrato de sódio foi a melhor condição analisada para a produção de 6g/L, uma tensão superficial de 22mN/m e um índice de emulsificação de 80%.

Outros nutrientes como fosfato e íons metálicos também influenciam na produção de biossurfactantes (Lin, 1996). Estudos reportados por Wei & Chu (1998) indicaram um aumento na produção de surfactina quando se aumentou a concentração de ferro no meio.

2.3.2 Resíduos Agro-Industriais como Substratos

O fator mais impactante na produção de biossurfactantes é o valor econômico vinculado à essa produção. Cerca de 30% do custo total de produção de surfactantes naturais está relacionado com a matéria-prima a ser utilizada. Reduzir esse custo utilizando recursos mais baratos é um aspecto primordial para o desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico e sucesso na produção industrial de biossurfactantes (Cameotra e Makkar, 1998).

Com isso, os estudos voltados à produção de biossurfactantes envolvem o desenvolvimento de técnicas adequadas e economicamente viáveis, buscando rendimentos equivalentes aos obtidos com surfactantes sintéticos.

O maior desafio está em selecionar um resíduo com a composição adequada de nutrientes que garantam o crescimento microbiano e, também, a produção do composto de interesse. Como já mencionado, a fonte de carbono traz grande influência na produção de biossurfactantes e é de conhecimento que resíduos agroindustriais contendo altos níveis de carboidratos ou lipídios suprem a necessidade de carbono para obtenção de biossurfactantes (Nitschke, 2004).

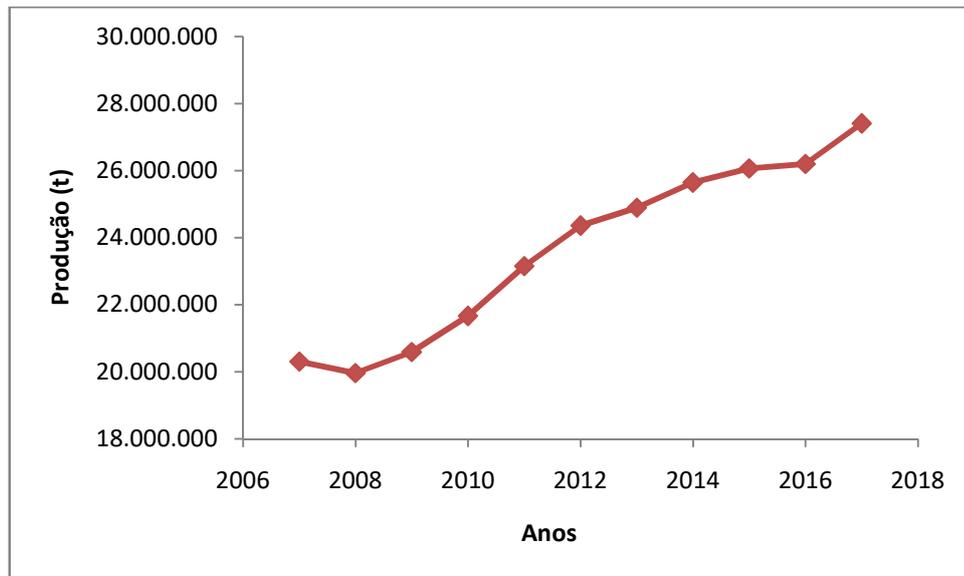
2.3.3 Uso de Resíduos do Abacaxi

Em todo o mundo há uma grande preocupação ambiental com a grande quantidade de resíduos gerados pelas indústrias agrícolas. De modo geral, os resíduos derivados do processamento de alimentos são ótimos recursos para o desenvolvimento de processos biotecnológicos e o uso sustentável desses subprodutos alimentares pode contribuir na redução das preocupações ambientais e na melhoria do crescimento econômico (Sepulvéda *et al.*, 2018).

O abacaxi é um pseudofruto da família Bromeliaceae e é uma das mais populares frutas tropicais do mundo, principalmente devido ao seu sabor e aroma marcantes (Coelho, 2012). O abacaxi é o único representante da família bromeliácea que é extensamente cultivado como fonte de alimento (Manetti *et al.*, 2009).

A produção de abacaxi cresce significativamente ao longo dos últimos anos. A figura 2 ilustra tal crescimento, no período de 2007 a 2017, considerando a quantidade plantada em toneladas.

Figura 2. Crescimento da Produção Mundial de Abacaxi (em toneladas) durante os anos de 2006 a 2018. (Fonte: FAOSTAT 2019).



Apesar de ser nativo da América do Sul, o abacaxi é atualmente cultivado em regiões tropicais, subtropicais e regiões de clima anemo no mundo todo, devido sua capacidade de adaptação, resistência à seca e facilidade de propagação. Cerca de 50% da produção global do fruto está concentrada no Brasil, Tailândia, Filipinas, Costa Rica e China (Rodríguez *et al.*, 2013).

O Brasil é o terceiro maior produtor de abacaxi no mundo, com uma produção anual de mais de 2.000.000 toneladas. (Figura 3). Considerando a soma da produção entre os anos de 2007 a 2017, o Brasil fica em primeiro lugar, com uma produção maior que 27.000.000 toneladas durante esse período (Figura 4).

Figura 3. Valores Médios da Quantidade Anual de Abacaxi Produzida nos Países de Maior Produção do Fruto (Fonte: FAOSTAT 2019).

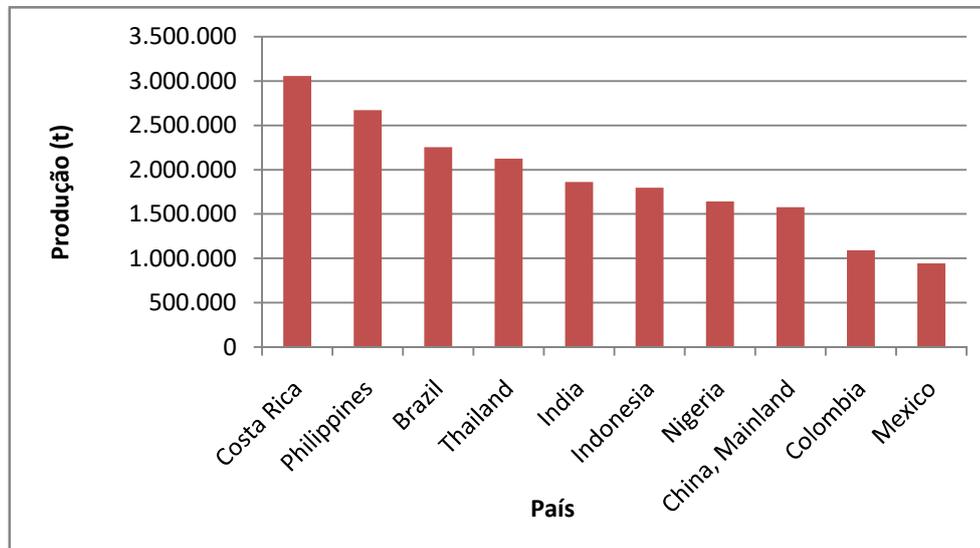
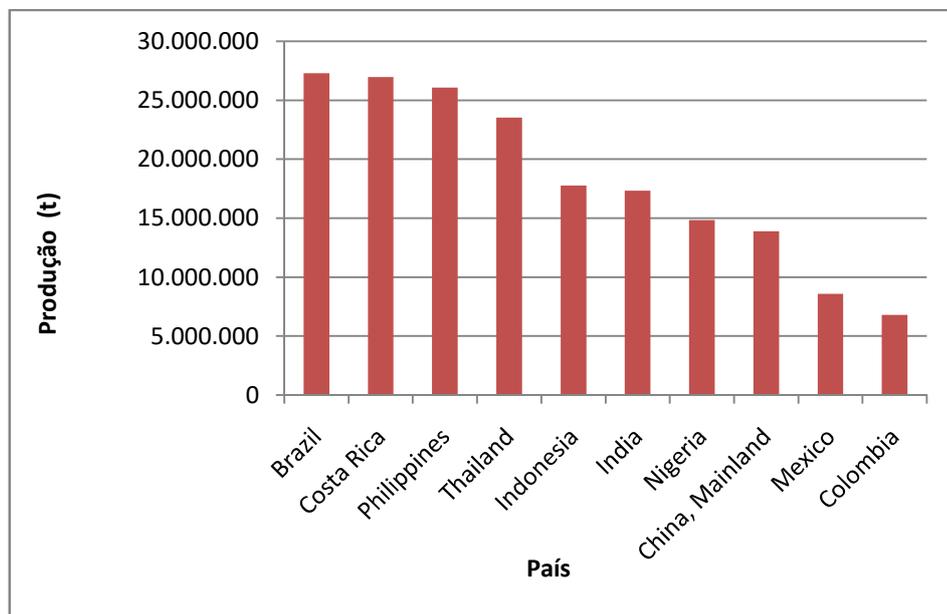


Figura 4. Maiores Produtores Mundiais de Abacaxi - Soma da Produção entre os anos de 2007 a 2017 (Fonte: FAOSTAT 2019).



Utilizado como matéria prima em diversas áreas industriais, o abacaxi tem sua maior proeminência como suco. Vários estudos publicados destacam o potencial energético do suco, uma vez que a fruta possui em sua composição grandes concentrações de açúcares, vários minerais como cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e vitaminas A, C, B1, e niacina. Apesar de todos esses componentes de energia, a quantidade de proteína e teor de gordura são menores de 0,5% (Lima *et al.*, 2010).

Apesar de ter sua maior utilização como fruta, o abacaxi também é amplamente utilizado na medicina popular devido a suas conhecidas propriedades medicinais, atuando como antiinflamatório e diurético (Coelho, 2012).

Nos processos industriais, os resíduos do abacaxi (casca, caule, folhas e coroa) são removidos e descartados antes de processados, representando cerca de 50% do peso total do abacaxi. Conseqüentemente, com o aumento da produção de abacaxi, aumenta-se a quantidade de resíduo gerado.

Isso leva a um grande número de estudos voltados à utilização dos resíduos do abacaxi e suas propriedades. Porém, a maioria das pesquisas está concentrada na recuperação de enzimas proteolíticas, como a bromelina, um grupo de proteases com diferentes aplicações em alimentos, têxteis, cosméticos e outros (Coelho *et al.*, 2012). Desta forma, há necessidade de novas estratégias para utilização de outros compostos de valor agregado disponíveis no resíduo do abacaxi, como o talo e a coroa (Sepúlveda *et al.*, 2018).

O estudo da utilização desses resíduos como substratos na produção de biossurfactantes tornou-se uma área promissora, uma vez que o substrato possui propriedades interessantes e favoráveis para o cultivo e crescimento de microrganismos. Além disso, o uso de grandes quantidades de resíduos de abacaxi resulta em redução de custos na produção de substrato de biossurfactantes, tornando o processo economicamente viável.

Ehrhardt (2015) estudou a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando o resíduo do abacaxi como substrato. A fermentação foi através de shakers e a efetividade do biossurfactante produzido foi medida pela tensão superficial e índice de emulsificação. A tensão superficial, utilizando apenas o resíduo do abacaxi como substrato, reduziu em 25% e o melhor índice de emulsificação obtido foi de 60% quando utilizando óleo de motor.

Este estudo confirmou a possibilidade na utilização do resíduo agro-industrial do abacaxi para produção de biossurfactantes, porém melhores resultados podem ser avaliados ajustando as condições do meio para melhorar o uso das propriedades do resíduo do abacaxi como substrato.

2.3.4 Resíduos de Óleos

O alto custo de produção de biossurfactantes sempre foi o maior problema para sua utilização, principalmente em escala industrial. Para minimizar esses custos, diferentes substratos renováveis ou matérias-primas de baixo custo têm sido utilizadas nos processos fermentativos de produção de surfactantes naturais como, por exemplo, resíduos de óleos.

O uso de óleo de cozinha é bastante comum e tem aumentado continuamente em todo o mundo. O uso de resíduos de óleos na produção de biossurfactantes pode ser uma solução interessante para aproveitar todo esse resíduo e reduzir os custos de produção.

Li *et al.* (2016) estudou a produção de biossurfactantes por *Bacillus pseudomycoides* utilizando resíduo de óleo de soja e confirmou uma excelente produção com alta atividade emulsificante (62,8% a 94,2%).

Lotfabad *et al.* (2017) confirmou a possibilidade de se produzir um bom biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* com um meio de cultura contendo resíduo de óleo de soja refinado. O estudo demonstrou que o biossurfactante produzido possui características semelhantes às de surfactantes produzidos por óleo de soja de alto custo, como por exemplo atividade superficial, CMC, além de características estruturais similares como nível e tipo de conteúdo homólogo.

Outra pesquisa apresentou a possibilidade em se produzir biossurfactantes também por *Pseudomonas aeruginosa* quando cultivadas em resíduo de óleo de girassol em diferentes condições. Benincasa e Accorsini (2008) confirmaram que resíduos desse óleo podem se converter em quantidades significantes de raminolipídeos (superior a 7g/L) e com rendimentos razoáveis.

2.4 Economia

2.4.1 Uso de fontes renováveis como substrato

Nos últimos anos, diversos estudos voltados à produção de biossurfactantes com diferentes tipos de microrganismos são reportados com uma variedade de dados de produção, tipos e propriedades dos surfactantes produzidos. Embora biossurfactantes apresentem claras vantagens em relação aos surfactantes sintéticos associadas a uma equivalência na atividade tensoativa e de emulsificação, a produção dos compostos orgânicos em escala industrial não é realizada devido aos altos custos e baixos rendimentos.

De acordo com Mukherjee *et al.* (2006), atualmente três medidas foram tomadas para mudar esse cenário e tornar esse processo mais competitivo:

- A. Uso de substratos renováveis e de baixo custo;
- B. Desenvolvimento de processos mais eficientes, incluindo o aprimoramento das condições de cultura, adotando processos de separação e recursos de baixo custo;
- C. Desenvolvimento e uso cepas mutantes ou recombinantes, para melhorar a eficiência de produção desses biossurfactantes.

Economicamente, o valor e tipo de matéria-prima utilizada como substrato para o crescimento do microrganismo é o fator mais preocupante do processo. Estima-se que cerca de 30% do custo total de produção está relacionado na obtenção de um substrato adequado para o desenvolvimento de tensoativos naturais (Cameotra and Makkar, 1998).

O uso de substratos renováveis se torna, portanto, bastante interessante para viabilizar tal produção. Uma possibilidade é o uso de matérias-primas e resíduos orgânicos de agroindustriais. Milhares de toneladas de resíduos são gerados a cada ano no mundo todo, e no Brasil esse grande setor agrário produz uma imensa quantidade e variedade de rejeitos (Faria, 2010).

Dentre as matérias-primas renováveis utilizadas na produção de biossurfactantes, estão os óleos vegetais, como descrito por Rahman *et al.* (2001) na produção de Rhamnolipids usando óleo de soja e óleo de girassol. Os resíduos obtidos nas refinarias de extração de óleos vegetais também são substratos promissores como apresentado by Benincasa *et al.* (2004) para a produção de glicolípídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Resíduos oleosos são alternativas interessantes quando utilizados com microrganismos adaptados a meios oleosos. Os compostos contendo óleo são degradados pelos microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fontes de carbono para obtenção de energia. Estudos mostram que microrganismos que são acostumados a crescerem em óleos são bons produtores de biossurfactantes (Decesaro *et al.*, 2013).

2.5 Aplicações

Como já mencionado, devido à presença de porções hidrofóbicas e hidrofílicas, os biossurfactantes são capazes de se distribuir nas interfaces entre fases fluidas de compostos

imiscíveis. Ocorre então a formação de um filme molecular que promove a redução da tensão superficial e interfacial, garantindo as propriedades apresentadas por estes compostos. Tais propriedades tornam essas moléculas aplicáveis em diferentes áreas industriais (Nitschke e Pastore, 2006).

Os biossurfactantes tem se tornado importantes tanto para aplicação industrial, quanto medicinal, devido a seus específicos modos de ação, facilidade de preparação, variedade de aplicação e vantagens em relação aos sintéticos (Sen, 2010). Podemos assim destacar o uso desses compostos na biorremediação, recuperação de óleo, medicina (como agentes antivirais, antitumorais e antimicrobianos), na área farmacêutica e de cosmetologia, na indústria de alimentos e de nanotecnologia, como agentes de superfície na dispersão de nanotubos de carbono (Faria, 2010). Eles também apresentam papéis fisiológicos naturais com o aumento da biodisponibilidade das moléculas hidrofóbicas e podem interagir com metais pesados contribuindo, assim, para uma melhoria na degradação de contaminantes químicos (Sen, 2010). O maior mercado para os biossurfactantes, entretanto, está voltado à indústria de petróleo, onde são utilizados na produção de óleos e também adicionados nas formulações de óleos lubrificantes (Van Dyke *et al.*, 1991).

Há também a possibilidade de aplicação em engenharia genética na produção de cepas para melhorar a desempenho de produção e rendimento (Kronemberger, 2007).

Uma produção de biossurfactantes bem sucedida irá depender do baixo custo do substrato com uma composição química adequada que permita o crescimento celular e produção de metabólitos secundários de interesse.

2.5.1 Biorremediação

A biorremediação é uma nova tecnologia que, através do uso de agentes biológicos capazes de modificar e decompor poluentes possibilita o tratamento de locais contaminados (Benedict *et al.*, 2003). Uma alternativa viável, do ponto de vista econômico, está baseada na destruição parcial ou total da estrutura molecular de diluentes ambientais através do uso de microrganismos (Sen, 2010).

O crescimento da superfície de interação água/óleo gerado por biossurfactantes resulta em uma aceleração na degradação de diferentes óleos que promovem a biorremediação de

água e solos contaminados em acidentes com derramamento de óleo, bastante comuns nos últimos anos e perturbador no ponto de vista social e ecológico (Nitschke e Pastore, 2002).

Biodegradação é um dos métodos mais eficientes para remoção de poluentes e a capacidade de biossurfactantes em emulsificar e dispersar óleo em água, aumenta a degradação desses compostos no meio ambiente (Nitschke e Pastore, 2002).

Estudos de Rahma *et al.* (1990) mostraram 83-98% de degradação de hidrocarbonetos na biorremediação de n-alcenos no lodo de óleo pela adição de biossurfactante produzido por ramnolipídeos, indicando o efeito benéfico destes compostos em baixas solubilidades.

Urum *et al.* (2004) examinaram a remoção de solo contaminado com óleo adicionando raminolipídios em comparação com a adição de surfactantes sintéticos. Ambos apresentaram resultados semelhantes nas quantidades de remoção, entretanto os autores consideraram o uso de biossurfactantes mais apropriado devido a este apresentar a mesma eficácia dos tensoativos químicos e possuírem vantagens de baixa toxicidade, biodegradabilidade e ser ecologicamente correto.

Outro estudo, bastante relevante, foi apresentado por Mukherjee *et al.* (2006) que demonstraram a efetividade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* na biodegradação de petróleo em solo contaminado na Índia e também apontaram que em adição a efetividade na solubilização de hidrocarbonetos de petróleo, existe a vantagem do fornecimento contínuo de surfactantes naturais, não tóxicos, biodegradáveis e de baixo custo.

2.5.2 Indústria de Alimentos

A busca por alimentos produzidos por ingredientes naturais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, aumentando também a busca das indústrias de alimentos em alternativas para reduzir a adição de componentes sintéticos (Faria, 2010).

Nessa área industrial, os biossurfactantes possuem uma vasta aplicabilidade, como agentes emulsificantes no processamento de matérias-primas, dando consistência e textura aos alimentos (Banat *et al.*, 2000) e influenciando também nas características reológicas da farinha utilizada nas padarias e emulsificação de gorduras na produção de produtos à base carne (Nitschke e Pastore, 2002).

Esses compostos também são aplicáveis no controle do processo de aglomeração de glóbulos de gordura e usados para estabilizar sistemas aerados. Nas padarias e indústrias de sorvetes, podem atuar na consistência e controlando e solubilizando aromatizantes (Nitschke e Costa, 2007).

Shepherd *et al.* (1995) confirmou que bioemulsificadores produzidos por *Candida utilis* possuem uma ação emulsificante mais efetiva do que produtos sintéticos comumente utilizados na indústria alimentícia, como a carboximetilcelulose, por exemplo.

Fahram *et al.* (2016) estudou diferentes aplicações de biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.* na indústria de alimentos. O estudo confirmou o uso desses compostos na remoção de metais pesados presentes em vegetais (batata, cebola, alho e rabanete), além de atividades antimicrobianas e anti-adesivas.

Além disso, a produtores de alimentos podem aproveitar seus subprodutos ou resíduos para sua própria produção de biossurfactantes (Makkar e Cameotra, 2012).

2.5.3 MEOR

A tecnologia de Recuperação de Óleo Aprimorada (EOR) é capaz de recuperar cerca de 30% do óleo presente em um reservatório. Devido ao fracasso das técnicas de recuperação primária e secundária para recuperar o óleo dos reservatórios, os interesses evoluíram em técnicas de recuperação terciária (MEOR).

A recuperação de óleo através de microrganismos e produtos de seu metabolismo é chamada de MEOR. Tal tecnologia consiste na produção de polímeros e surfactantes naturais por microrganismos capazes de reduzir a tensão superficial das rochas de óleo, reduzindo forças capilares que impedem o movimento do óleo entre os poros de rochas. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e quebra de filme de óleos em rochas (Nitschke e Pastore, 2002).

O uso de surfactantes naturais em MEOR pode envolver a injeção do microrganismo produtor em um reservatório com subsequente *in-situ* propagação de microrganismos pelo reservatório de rocha, ou pode envolver a injeção de nutrientes selecionados em um reservatório, para favorecer o crescimento de microrganismos produtores de biossurfactantes.

MEOR possui uma série de vantagens quando comparada a tecnologias EOR, como o menor consumo de energia e por não depender do custo do óleo bruto. Além disso, as

substâncias injetadas possuem baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e são efetivas em uma larga escala de temperatura e pH (Fernandes *et al.*, 2016).

Amani *et al.* (2010) realizaram um estudo comparativo de bactérias produtoras de biossurfactantes em aplicações MEOR. O estudo mostrou que o tensoativo produzido por *Bacillus subtilis* possui boas propriedades para o uso em recuperação de óleo, superior a 25%.

2.5.4 Farmacêutico

Na última década, as pesquisas por biossurfactantes pelas áreas médicas e farmacêuticas cresceram consideravelmente devido às propriedades físico-químicas e biológicas, a boa compatibilidade com a pele e a aceitação ecológica que essas moléculas possuem.

Uma aplicação em potencial de surfactantes naturais na área médica é uma adequada alternativa para substituir drogas e agentes terapêuticos sintéticos. Os biossurfactantes interagem com as moléculas das células de superfície, rompendo membranas através da emulsificação de lipídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos. Ou ainda, tais compostos podem interagir com superfícies sólidas e afetar a adesão de células microbianas (Faria, 2010).

Além disso, alguns surfactantes naturais possuem uma vasta aplicação farmacêutica como a habilidade em inibir a formação de coágulos e possuir atividade antimicrobiana, antitumoral e antiviral (Nitschke e Pastore, 2002).

Tensoativos naturais também possuem um grande potencial como detergente, emulsificante, estabilizante, dispersantes e formadores de espumas, propriedades de grande utilidade para o desenvolvimento de medicamentos e cosméticos.

Atualmente, diversos compostos naturais e polímeros podem ser utilizados na reconstrução ou regeneração de tecidos e alguns metabólitos bioativos são destacados pela sua potencial aplicação dermatológica. Zouari *et al.* (2016) estudou a evolução da cura de uma ferida na derme e a eficiência de um anti-oxidante *in vitro* de um biossurfactante produzido *Bacillus subtilis*. O estudo mostrou que o gel a base de biossurfactante foi capaz de acelerar a cicatrização, além de serem considerados atraentes candidatos para um tratamento auspicioso de feridas devidos suas propriedades anti-oxidantes, antifúngicas e antimicrobianas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização do Abacaxi

O extrato de abacaxi foi obtido da casca do tipo Pérola. A casca, parte desprezada do fruto, foi processada em um processador de alimentos tradicional, filtrada com auxílio de gaze e, então, centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos a 25°C, para remoção das partículas insolúveis.

A caracterização do processado de casca do abacaxi foi realizada através da análise da composição de açúcares, concentração de lipídios e proteínas e análise do pH.

Após a caracterização, o extrato do resíduo do abacaxi foi utilizado como substrato para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* e essa produção avaliada através das análises de tensão superficial e índice de emulsão.

3.1.1 Concentração de Açúcares

Para avaliação da composição de açúcares presentes no extrato foi realizada a quantificação de glicose, sacarose frutose através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando o cromatógrafo 1260 Infinity HPLC Agilent Technologies com detector RID.

As soluções padrão para os açúcares foram preparadas na faixa de concentração de acordo com a tabela 1. Para realização da análise, foi utilizada a coluna Aminex HPX – 87P a 85°C, com água como fase móvel. O fluxo da fase móvel foi de 0,6mL/ min e o volume de injeção das amostras foi de 20µL. Os compostos foram separados da fase estacionária e monitorados num tempo de corrida de 20 minutos.

Tabela 1. Faixas de Concentração dos padrões de açúcares quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

| Padrão | Faixa de Concentração (g/L) |
|----------|-----------------------------|
| Sacarose | 0 – 20 g/L |
| Glicose | 0 – 20 g/L |
| Frutose | 0 – 20 g/L |

A concentração de cada componente foi obtida através da correlação entre os cromatogramas e as curvas padrão.

3.1.2 Quantificação de Proteína

Para a determinação da concentração de proteína presente no extrato da casca do abacaxi, foi utilizado o método de Bradford (1976), que se baseia na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma-Aldrich) e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

Para quantificar as proteínas, realizou-se uma curva de calibração e, posteriormente, fez-se a leitura das amostras em espectrofotômetro a 595nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Trata-se de um método rápido no qual a reação de ligação com o corante é completada em cerca de dois minutos. Vale ressaltar também que neste ensaio há pouca ou nenhuma interferência de cátions ou carboidratos como, por exemplo, a sacarose (Coelho, 2012).

3.1.3 Quantificação de Lipídios

A quantificação de lipídios foi realizada baseada no Método e Bligh-Dayer (1959).

Os lipídios apresentam propriedades físicas que refletem o caráter hidrofóbico dos compostos, sendo solúveis em solventes orgânicos. Desta forma, tais solventes são utilizados na determinação da gordura pelo processo de extração.

A amostra foi tratada com uma mistura de metanol e clorofórmio e as camadas separadas por centrifugação.

A quantidade de lipídios foi calculada através da diferença de peso utilizando um béquer previamente tarado, com base na equação (1), onde p representa o peso de lipídios (g) contido em 5 mL e g representa o peso da amostra.

$$\% \text{ lipídios totais} = \frac{p \times 4}{g} \times 100 \quad (1)$$

A análise foi feita em duplicata e os resultados comparados com os dados obtidos na Tabela de Composição de Alimentos.

3.1.4 pH

O pH dos extratos de casca de abacaxi foram medidos à 25°C, em duplicata, antes de cada análise realizada.

3.2 Produção de Biossurfactante

3.2.1 Microrganismo

As fermentações foram realizadas utilizando a bactéria *Bacillus subtilis* obtida da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústrias do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).

O cultivo e preservação da bactéria em questão foram obtidos através de repiques mensais. Tal processo permite a conservação do *Bacillus*, prevenindo de contaminações e mutações e garantindo a viabilidade de uso.

Mensalmente, cinco tubos de repique foram preparados. Os tubos, contendo ágar nutriente foram autoclavados por 15 minutos e deixados em repouso até esfriar. O repique então foi realizado atrás da chama de bico de bunsen, em ambiente previamente esterilizado, com auxílio de alça de platina. Após esse processo, os tubos foram incubados por 24 horas e, posteriormente, mantidos sob refrigeração a 4°C para desacelerar o metabolismo celular do *Bacillus subtilis* e estes serem utilizados posteriormente nas análises.

3.2.2 Pré-Inóculo e Inóculo

O biossurfactante foi produzido através de fermentações com auxílio de shaker com agitação constante de 150 rpm e temperatura ajustada em 37°C. Tais condições, de acordo com o presente em literaturas, são consideradas ótimas para o desenvolvimento da bactéria *Bacillus subtilis*. Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo em um erlenmeyer contendo 15mL de uma solução aquosa composta por peptona, cloreto de sódio e glicose (0,76%, 0,06% e 5%, respectivamente). Tal solução foi autoclavada, por 15 minutos a 120°C e, após resfriada, a cultura de *Bacillus subtilis* foi inoculada utilizando alça de platina, com auxílio de bico de Bunsen, em um ambiente previamente limpo e esterilizado. O erlenmeyer foi então deixado em shaker por 6 horas sob as mesmas condições de agitação e temperatura previamente descritas. Tal procedimento permitiu a adaptação do microrganismo nas condições de meio impostas e, conseqüente, o início de seu crescimento.

Posteriormente, o inóculo foi preparado utilizando 100mL da mesma solução aquosa contendo peptona, cloreto de sódio e glicose. Então, 10mL do pré-inóculo já adaptado ao meio nutriente após 6 horas, foi transferido para o frasco do inóculo e este mantido em shaker sob as mesmas condições de temperatura e agitação, por uma noite, garantindo o crescimento da bactéria.

A padronização do inóculo foi realizada em espectrofotômetro em uma faixa de absorvância de 0.08 a 0.1, em um comprimento de onda de 625nm.

3.2.3 Processo de Fermentação

As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 250mL, com auxílio shaker, por 24 horas, mantendo as condições de temperatura e agitação utilizadas no preparo do inóculo (37°C e 150 rpm, respectivamente).

Os meios utilizados nas fermentações variaram de acordo com as análises e necessidade de adaptação do processo, a fim de se obter o máximo rendimento.

As fermentações foram nomeadas como Fermentação A, B, C e D, sendo que cada uma corresponde a uma etapa da pesquisa proposta.

Todas utilizaram o resíduo de abacaxi processado para avaliar se a composição de açúcar presente no rejeito seria o suficiente para nutrir e garantir a energia necessária ao *Bacillus subtilis* para seu desenvolvimento e, conseqüentemente, produção de biossurfactante.

Tal utilização garante uma redução no custo de produção, uma vez que seria empregado como substrato uma fonte renovável, proveniente dos rejeitos agro-industriais.

Para as fermentações A, B e C foram analisados apenas os pontos inicial e final (ponto tempo zero e tempo 24 horas).

3.2.3.1 Processo Fermentativo A

Para a fermentação A, cinco tipos diferentes de meio foram testados, conforme composições apresentadas na tabela 2, todos contendo a mesma quantidade de resíduo de abacaxi, complementado com diferentes fontes de carbono e nitrogênio para contribuir no desenvolvimento do microrganismo e conseqüentemente, na produção de biossurfactante.

A quantidade de resíduo utilizada foi calculada baseada na análise de concentração de açúcares realizada em substituição a 5% de glicose (quantidade utilizada em fermentações realizadas no projeto de mestrado).

Tal fermentação foi realizada para confirmação da capacidade do resíduo do abacaxi em atuar com substrato de baixo custo.

Tabela 2. Composição dos cinco meios avaliados na Fermentação A – quantidade de resíduo de abacaxi e fontes de carbono e nitrogênio.

| Meio | Composição | |
|------|--------------------|--|
| | Resíduo de Abacaxi | Fontes de Nitrogênio e Carbono |
| I | 55mL | 0,76g peptona + 0,06g NaCl |
| II | 55mL | 0,76g extrato de levedura + 0,06g NaCl |
| III | 55mL | 0,76g sulfato de amônia + 0,06g NaCl |
| IV | 55mL | 0,76g citrato de amônia + 0,06g NaCl |
| V | 55mL | 0,76 nitrato de amônia + 0,06g NaCl |

Após a fermentação A, a produção de biossurfactante foi avaliada através das análises de tensão superficial, índice de emulsão, colapso da gota e biomassa.

Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.2.3.2 Processo Fermentativo B

Para desenvolvimento da fermentação B, primeiramente, foi avaliado qual dos cinco meios testados na fermentação A obteve melhor rendimento. A partir disso, foi realizado um planejamento experimental com três variáveis: concentração de inóculo, concentração de glicose e volume de resíduo de abacaxi.

A tabela 3 apresenta a composição do meio avaliado e a tabela 4 as concentrações das variáveis avaliadas.

Tabela 3. Composição do substrato utilizado na fermentação B – Meio com maior rendimento.

| Meio | Composição |
|---------------|--|
| Fermentação B | Resíduo de Abacaxi + Glicose + 0,76g de Peptona + 0,06g NaCl |

Tabela 4. Concentrações das variáveis: concentração de inóculo, glicose e volume de resíduo de abacaxi, para realização do planejamento experimental 1.

| Variáveis | -1 | 0 | +1 |
|---------------------------|------|------|------|
| Concentração Inóculo | 10% | 12% | 15% |
| Concentração Glicose | 3% | 5% | 7% |
| Volume Resíduo de Abacaxi | 55mL | 75mL | 95mL |

Após a fermentação B, a produção de biossurfactante foi avaliada através da análise de tensão superficial.

3.2.3.3 Processo Fermentativo C

A fermentação C foi realizada após obtenção do resultado do planejamento experimental 1.

Esta fermentação teve objetivo ajustar as condições da fermentação anterior, de acordo com o resultado obtido na análise estatística. Desta forma, um novo planejamento foi realizado utilizando uma nova composição de meio (tabela 5), mantendo os componentes presentes na fermentação B, porém agora sem a adição de glicose.

Tabela 5. Concentrações das variáveis: concentração de inóculo e volume de resíduo de abacaxi, para realização do planejamento experimental 2.

| VARIÁVEIS | -1 | 0 | 1 |
|---------------------------|------|------|------|
| Concentração Inóculo | 10% | 12% | 15% |
| Volume Resíduo de Abacaxi | 55mL | 75mL | 95mL |

Após a fermentação C, a produção de biossurfactante foi avaliada através da análise de tensão superficial.

3.2.3.4 Processo Fermentativo D

Com os resultados da fermentação C e análise estatística correspondente, a condição com melhor rendimento obtido foi avaliada separadamente.

O processo fermentativo D foi realizado em três momentos. Em um primeiro momento a fermentação foi realizada com os seis erlenmeyers de 250 mL de acordo com a composição apresentada na tabela 6. Cada frasco foi devidamente fechado com tampas de gaze e algodão, revestidas por papel alumínio, para evitar contaminação. Foram, então, mantidos sob agitação constante, a 37 °C, por 24 horas. Neste período, foram retiradas sete amostras: uma inicial (tempo zero), uma segunda após 1 hora de fermentação, as 4 seguintes em intervalos de 2 horas cada e uma última amostra após 24 horas de fermentação. A amostra do ponto inicial de fermentação retirada para análise foi utilizada como controle, ou seja, como ponto de comparação em relação às amostras retiradas durante o processo fermentativo. Tais amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos e submetidas à determinação de tensão superficial e índice de emulsificação, biomassa e colapso da gota. Importante ressaltar que cada amostra foi retirada de um frasco diferente (com exceção da amostra tempo zero e da amostra após uma hora de fermentação), para evitar possíveis contaminações.

Posteriormente, uma nova fermentação nas mesmas condições foi realizada tirando apenas os pontos iniciais e finais para análises de estabilidade, purificação e caracterização. E, em um terceiro e último momento, repetiu-se a mesma fermentação, apenas com os pontos inicial e final para realização de análises voltadas à aplicação do biossurfactante produzido.

Para essas duas últimas fermentações, apenas a tensão superficial foi avaliada.

Tabela 6. Composição do melhor meio de fermentação para análises de estabilidade, purificação, caracterização e aplicação do biossurfatcante - Processo fermentativo D.

| MEIO | COMPOSIÇÃO | |
|---------------|-----------------|------------|
| | Componente | Quantidade |
| Fermentação D | Resíduo Abacaxi | 95mL |
| | Peptona | 0,76g |
| | NaCl | 0,06g |
| | Inóculo | 15% |

3.3 Análises da Efetividade de Produção

3.3.1 Tensão Superficial

As análises de tensão superficial foram realizadas utilizando o tensiômetro da marca Kruss, modelo K12.

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, à 25°C e 3500 rpm e o sobrenadante retirado para leitura.

3.3.2 Índice de Emulsão (E_{24})

A emulsificação foi medida através da relação óleo/ biossurfactante, de acordo com a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987), utilizando óleo de soja.

Em tubos graduados foram adicionados 1 mL de óleo e 1 mL do biossurfactante produzido. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e mantidos em repouso por 24 horas. Após esse período, o índice de emulsão foi analisado através de cada de emulsão formada e da camada total presente no tubo. O cálculo do índice de emulsão foi realizado de acordo com a equação (2):

$$\% = \frac{\text{altura camada de emulsão} \times 100}{\text{altura total}} \quad (2)$$

Para realização desse teste, a amostra foi submetida à centrifugação a 25°C, 3500 rpm por 10 minutos e o volume necessário para análise foi retirado do sobrenadante.

3.3.3 Biomassa

Para análise da biomassa, o caldo de fermentação foi centrifugado a 25°C, 3500rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o corpo de fundo ressuspensionado com 5 mL de água destilada e, então, transferido para uma placa de Petri, previamente pesada. As placas foram deixadas em estufa a 100°C, por 24 horas. Após esse período, elas foram resfriadas e pesadas novamente. A biomassa foi então calculada pela diferença de peso.

3.3.4 Colapso da Gota

A análise do colapso da gota foi realizada através do método de Bodour e Miller Maier (1998) modificado. Trata-se de um método qualitativo para observar a produção ou não de biossurfactante.

Em placas de Petri foram adicionadas uma gota da amostra, pós-fermentação, centrifugada e sobre esta, adicionou-se uma gota de óleo de soja. O colapso da gota seria um indicativo da produção de biossurfactante. Os testes foram realizados em duplicata.

3.4 Planejamentos Experimentais

Dois planejamentos experimentais foram realizados com o objetivo de otimizar a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, utilizando resíduo do abacaxi como substrato, avaliando a influência de diferentes variáveis na composição do meio.

As fermentações foram desenvolvidas utilizando o meio de melhor rendimento da Fermentação A, conforme descrito anteriormente.

Primeiramente, desenvolveu-se um planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, no qual as variáveis estudadas foram: concentração de inóculo, concentração de glicose e volume de resíduo de abacaxi, resultando em 12 ensaios. A tensão superficial foi realizada para cada ensaio e, então, avaliada a significância dos parâmetros variados. Em seguida, um novo planejamento 2^2 com 4 pontos centrais foi realizado para otimizar os parâmetros significativos das análises.

Os planejamentos e análises estatísticas foram realizados através do software *Statistica* (v.10), utilizando as ferramentas de superfície de resposta, curvas de nível e gráficos de Pareto.

3.5 Testes Estabilidade

As análises de estabilidade foram realizadas baseadas em Barros (2008). Avaliou-se a capacidade do biossurfactante se manter ativo frente às alterações de pH, temperatura e concentrações salinas.

Para desenvolvimentos dessas análises, as amostras retiradas após uma fermentação de 24 horas foram centrifugadas à 25°C, 3500 RPM, por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido a uma leitura de tensão superficial inicial e, após os testes de estabilidade, a tensão

superficial foi novamente medida avaliando, portanto, a capacidade do biossurfactante em permanecer estável.

3.5.1 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica foi avaliada em duas diferentes temperaturas, por períodos diferentes de exposição, conforme apresentado na tabela 7.

Após exposição térmica, os tubos foram resfriados e a leitura da tensão superficial realizada.

Tabela 7. Condições de temperatura e tempo de exposição das amostras para teste de estabilidade térmica do biossurfactante produzido.

| Frasco | Temperatura (°C) | Tempo de Exposição (min) |
|---------------|-------------------------|---------------------------------|
| 1 | 100 | 20 |
| 2 | 100 | 40 |
| 3 | 100 | 60 |
| 4 | 100 | 80 |
| 5 | 100 | 100 |
| 6 | 100 | 120 |
| 1 | 121 | 20 |
| 2 | 121 | 40 |
| 3 | 121 | 60 |

As análises foram realizadas em duplicata.

3.5.2 Estabilidade frente a mudanças de pH

Foi avaliada a estabilidade do biossurfactante produzido através da adição de solução tampão fosfato com pH 4, 5, 6, 7 e 8, em duas proporções 1:1 e 1:2 (solução tampão: amostra). As misturas foram agitadas em vórtex por 1 minuto e submetidas à leitura da tensão superficial.

3.5.3 Estabilidade frente à força iônica

Em tubos de ensaio contendo a amostra centrifugada, adicionaram-se soluções salinas em diferentes concentrações, nas proporções de 1:1 e 1:2 (solução salina: amostra). As concentrações de NaCl avaliadas foram: 2,5%, 5,0%, 10,% e 20,0%.

Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e, posteriormente, foi medida da tensão superficial.

3.6 Purificação e Caracterização Iônica

3.6.1 Purificação

A purificação do surfactante natural produzido foi realizada baseada na metodologia proposta por Silva *et al.* (2010). O processo permite a separação do biossurfactante presente no meio de fermentação, dos demais subprodutos gerados pelo microrganismo, garantindo que análises de identificação e aplicabilidade obterão resultados condizentes.

Para purificação do biossurfactante produzido, o produto de fermentação foi centrifugado à 25°C, 8.000 rcf, por 20 minutos e seu pH ajustado para 2, com a adição de HCl 6,0M.

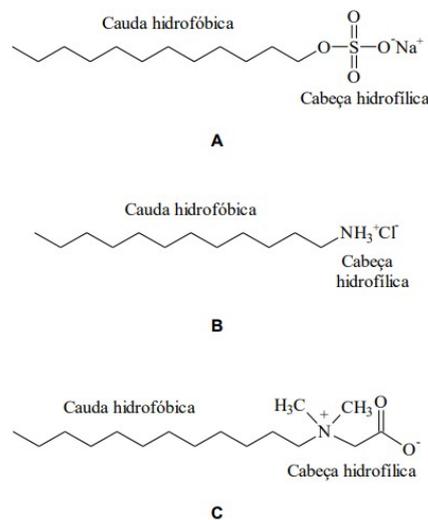
Ao sobrenadante, foi adicionada uma mesma quantidade de solução Clorofórmio/Metanol (2:1) e agitou-se vigorosamente por 15 minutos. A mistura foi então deixada em repouso até a separação de fases e a fase orgânica removida. O processo foi repetido mais duas vezes, garantindo a total separação e remoção.

O produto foi deixado em estufa à 50°C até obtenção de um composto amarelo acastanhado. Por fim, adicionou-se metanol e o produto foi concentrado novamente em estufa à 50°C até total evaporação do solvente.

3.6.2 Caracterização Iônica

Como já apontado, os biossurfactantes são caracterizados por apresentarem duas coesões: uma hidrofóbica e outra hidrofílica. Usualmente, a porção apolar é composta por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas, grupos aromáticos ou policíclicos e sua a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou anfotérica, como demonstrados nos exemplos da figura 5.

Figura 5. Estruturas de surfactantes sintéticos A. Dodecil sulfato de sódio (aniônico); B. Cloreto de dodecilamônio (catiônico); C. N-dodecil-N, N-dimetilbetaína (anfótero). (Fonte: Barbosa, 2004).



A carga iônica do biossurfactante foi realizada através da técnica de dupla difusão em ágar (Van Oss, 1968). Duas fileiras de poços, regularmente espaçadas, foram realizadas com ágar 1%. Os poços de uma fileira foram preenchidos com a solução do biossurfactante produzido e os poços da outra fileira foram preenchidos com compostos de carga iônica conhecida. O composto aniônico utilizado foi o Dodecilsulfato de Sódio (SDS) 20mM e o catiônico foi o cloreto de bário, 50mM. A análise foi observada por um período de 48 horas, à temperatura ambiente. O surgimento de linhas de precipitação entre os poços indicam a característica iônica do biossurfactante produzido.

3.7 Aplicação

Como já mencionado anteriormente, uma das vantagens dos biossurfactantes é sua vasta aplicação de acordo com as propriedades que este apresentar.

A atividade emulsificante (E_{24}) foi avaliada com quatro diferentes hidrocarbonetos, a fim de se verificar a possibilidade de utilização do biossurfactante produzido.

A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cooper & Goldenberg (1987), adicionando 2mL do biossurfactante produzido em um tubo de ensaio com tampa e mais 2mL do hidrocarboneto. Agitou-se por vórtex por 1 minuto e manteve-se em repouso por 24 horas. O índice (E_{24}) foi determinado ao se dividir a altura da camada emulsificada pela altura total e multiplicando por 100.

Os hidrocarbonetos testados foram: óleo de soja, óleo de milho, querosene e óleo de motor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do Abacaxi

4.1.1 Concentração de açúcares

Para produção de biossurfactantes por bactérias faz-se necessária a presença de fontes de energia para o desenvolvimento do microrganismo e conseqüente produção. A quantidade de açúcar presente no substrato tem relação direta com a qualidade e quantidade do surfactante natural a ser produzido.

Desta forma, é de grande valia saber a quantidade de açúcar presente no resíduo utilizado e avaliar a necessidade de enriquecer o meio.

Como já mencionado, foram quantificados três tipos de açúcares presentes no resíduo do abacaxi: glicose, sacarose e frutose, através da técnica de HPLC.

As figuras 6, 7 e 8 apresentam as curvas obtidas de concentração de cada açúcar avaliado. Os resultados apresentaram que o resíduo de abacaxi contém em sua composição uma média de 22,0g/L \pm 0,36 de glicose, 42,3g/L \pm 0,29 de sacarose e 26,8g/L \pm 0,24 de frutose. Tais quantidades representam mais de 90g de açúcar por litro de resíduo, evidenciando um excelente potencial energético para utilização casca do abacaxi como substrato orgânico renovável na produção de biossurfactantes.

Figura 6. Curva para Quantificação de Frutose obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

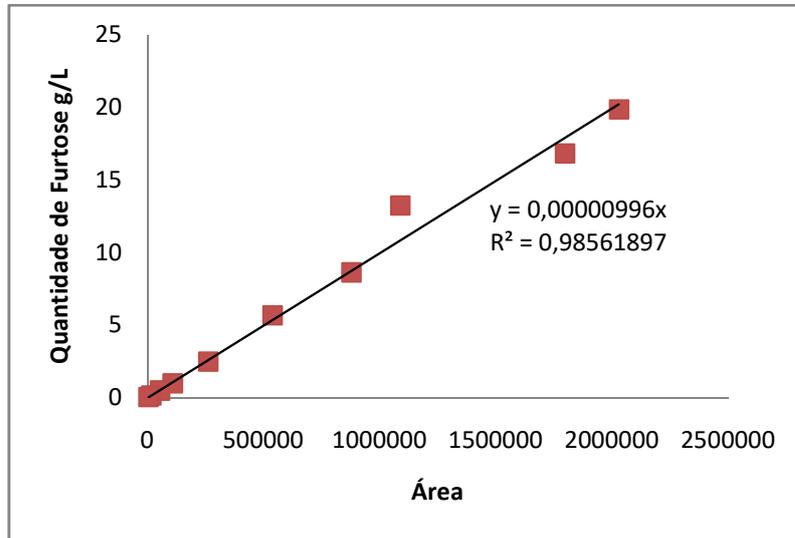


Figura 7. Curva para Quantificação de Glicose obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

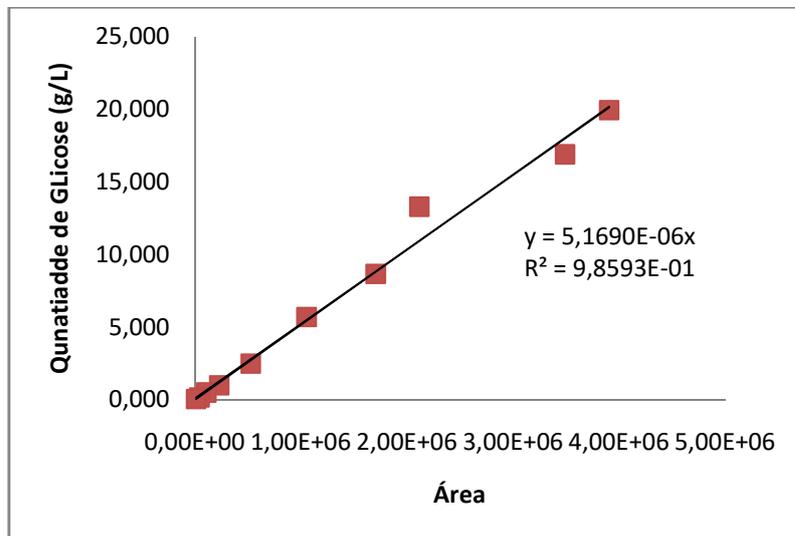
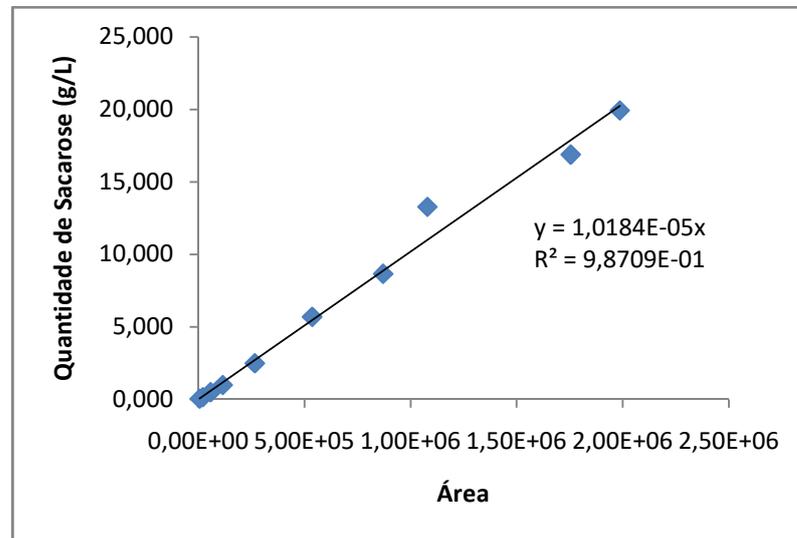


Figura 8. Curva para quantificação de Sacarose obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).



Sepúlveda *et al.* (2018) avaliaram a quantidade de açúcares redutores e açúcares totais presente no resíduo do abacaxi obtido através da casca e caule, apresentando resultados de 82% de açúcares totais, incluindo 55% de açúcares redutores e 27% de não redutores.

A concentração de frutose, glicose e sacarose também foi estudada por Leonel *et al.* (2014) utilizando uma farinha proveniente da casca do abacaxi. Tal estudo apresentou 3,71% de frutose, 2,95% de glicose e 4,3% de sacarose.

Jusoh *et al.* (2014) reportaram resultados de 70% de açúcares (na base seca), compostos principalmente por sacarose, glicose e frutose, quando obtidos através da fermentação do resíduo líquido do abacaxi.

A variação da quantidade de açúcares obtidas em diferentes estudos está relacionada ao tipo de abacaxi analisado, partes do resíduo utilizadas, técnicas analíticas para obtenção dos resultados, além das condições do solo de cultivo, condições climáticas regionais e épocas de colheita que interferem diretamente no estágio de maturação dos frutos.

4.1.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada para avaliar o teor protéico presente na casca do abacaxi, uma vez que a proteína é um componente de grande valor nutricional ao microrganismo, favorecendo a produção de biossurfactante. A partir da curva de calibração e

fazendo a leitura da amostra do resíduo do abacaxi processado, foi possível quantificar a proteína presente no caldo.

Com a equação da reta obtida foi possível realizar o cálculo da quantidade de proteína presente na amostra, obtendo um resultado de $7,38\text{mg/mL} \pm 0,06$ de proteína no caldo de casca do abacaxi.

Com base na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos cada 100g de abacaxi cru possui em sua composição 0,9g de proteínas. Tal valor leva em consideração apenas a parte comestível da fruta e não o resíduo, como no presente estudo.

Abílio *et al.* (2009) quantificou as proteínas presentes na casca do abacaxi, obtendo um resultado de $7,0\text{mg/mL}$. Tal estudo comparou o teor protéico da casca com o presente na polpa do abacaxi, que apresentou apenas $3,8\text{mg/mL}$. Desta forma, nota-se que a casca é uma melhor fonte de proteína do que a polpa, ressaltando a importância de utilização dos resíduos industriais de abacaxi que são, normalmente, descartados.

Gondim *et al.* (2005) analisou a composição de diferentes cascas de frutas com o objetivo de incentivar o reaproveitamento de resíduos de alimentos e oferecer uma alternativa nutritiva e de baixo custo. Suas análises resultaram em teores de proteína de 1,45% quando analisado a casca do abacaxi, valores próximos aos obtidos por Bortolatto e Lora (2009), cujo trabalho avaliou a composição centesimal do abacaxi in natura, obtendo $1,47\% \pm 0,197$ de proteínas.

4.1.3 Quantificação de Lipídios

Os lipídios representam um dos principais componentes presentes em produtos alimentícios. A tabela 8 apresenta os valores do peso das amostras inicial e seca, utilizados para o cálculo da quantidade de lipídios contida no resíduo do abacaxi.

Tabela 8. Massas das amostras obtidas na análise de quantificação de lipídios presentes no resíduo de abacaxi.

| Ensaio | Massa Amostra(g) | Peso béquer vazio (g) | Peso béquer com amostra seca (g) |
|--------|------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 1 | 3,168 | 34,4214 | 34,4239 |
| 2 | 3,074 | 35,1289 | 35,1321 |

Conforme equação (2), apresentada anteriormente, com os valores das massas obtidos foi possível calcular a porcentagem de lipídios totais presente no resíduo do abacaxi, obtendo uma média de $0,366\% \pm 0,05$. A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) aponta que a parte comestível do fruto possui cerca de 0,1g de lipídios, a cada 100g da parte comestível. Desta forma, é possível avaliar que o resíduo do abacaxi apresenta uma quantidade de lipídios compatível com o apresentado na tabela, além de evidenciar que a presença desses compostos é de grande valia para o desenvolvimento dos microrganismos e, conseqüentemente, para a produção de biossurfactantes.

Um estudo realizado por Leonel *et al.* (2014) apresentou 0,38% de lipídios quando analisada uma farinha obtida com através da desidratação e processamento da casca do abacaxi.

Miranda (2015) estudou a caracterização físico-química da casca do abacaxi desidratado e obteve resultados próximos aos encontrados na TACO, com valores de $0,35\% \pm 0,01$ de lípidos.

4.1.4 pH

As leituras do pH foram realizadas a fim de se observar possíveis alterações no resíduo. A constante faixa de pH é de grande importância uma vez que este é um fator crítico nos processos de fermentação. Alterações do pH do meio podem desfavorecer o desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, a produção de biossurfactantes. O *Bacillus subtilis* é considerada uma bactéria de fácil reprodução e adaptação, porém ao se trabalhar em condições ótimas e estáveis de temperatura, agitação e pH garante um melhor desempenho do microrganismo e maiores rendimentos.

Tabela 9. Resultados das leituras de pH dos extratos de resíduos de abacaxi.

| | pH |
|-----------------------|-----------------|
| Ensaio 1 ^a | $3,76 \pm 0,02$ |
| Ensaio 2 ^b | $3,94 \pm 0,00$ |
| Ensaio 3 ^c | $3,81 \pm 0,01$ |

^a Leituras realizadas com o extrato processado para análises de HPLC.

^b Leituras realizadas com o extrato processado para realização das análises de Bradford e lipídios.

^c Leituras realizadas com o extrato processado para realização da fermentação A.

4.2 Processo Fermentativo A

4.2.1 Tensão Superficial

Uma das principais análises indicativas da produção de biossurfactantes é a de tensão superficial. A diminuição da tensão ao longo da fermentação evidêcia o aumento da produção. As leituras da tensão foram realizadas com auxílio de tensiômetro, previamente calibrado, garantindo maior precisão nos resultados. Antes do início de todas as leituras, foi realizada uma leitura com água, ua vez que a tensão superficial da água é conhecida, a fim de certificar a efetividade da calibração.

A tabela 10 e a figura 9 apresentam os resultados obtidos com a leitura da tensão superficial para os cinco diferentes meios testados. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os melhores resultados foram obtidos com os meios I contendo peptona, II contendo extrato de levedura e IV contendo citrato de amônia, com uma média de redução da tensão de $34,94\% \pm 1,1$, $29,70\% \pm 0,9$ e $27,87\% \pm 1,4$, respectivamente. O meio I foi o que apresentou maior rendimento, com a tensão chegando a $32,56$ mN/m.

O meio III, contendo sulfato de amônia apresentou uma pequena queda na tensão chegando a uma redução de apenas $15,79\% \pm 0,8$. E o meio V, com nitrato de amônio não apontou resultados favoráveis, com uma mínima redução nas duas primeiras amostras avaliadas e última amostra testada não apresentou diferença na tensão superficial inicial para a tensão superficial final, o que denota a não produção de biossurfactante.

Tabela 10. Avaliação da produção de biossurfactante através da tensão superficial após fermentação de 24 horas com cinco diferentes meios como substrato.

| | Ensaio | Tensão Superficial Inicial (mN/m) | Tensão Superficial 24h (mN/m) | Redução da Tensão (%) |
|-----------------|--------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Meio I | 1 | 53,14 | 35,48 | 33,23 |
| | 2 | 57,10 | 47,13 | 34,97 |
| | 3 | 51,38 | 32,56 | 36,63 |
| Meio II | 1 | 52,72 | 37,11 | 29,61 |
| | 2 | 54,19 | 38,81 | 28,38 |
| | 3 | 49,07 | 33,80 | 31,12 |
| Meio III | 1 | 48,07 | 41,54 | 13,58 |
| | 2 | 47,75 | 39,45 | 17,38 |
| | 3 | 44,35 | 37,07 | 16,41 |
| Meio IV | 1 | 53,12 | 38,41 | 27,69 |
| | 2 | 54,26 | 39,66 | 26,90 |
| | 3 | 56,84 | 40,35 | 29,01 |
| Meio V | 1 | 43,73 | 40,69 | 6,95 |
| | 2 | 44,54 | 42,59 | 4,38 |
| | 3 | ----- | ----- | ----- |

----- Não se observou produção de biossurfactante

Meio I – peptona + NaCl

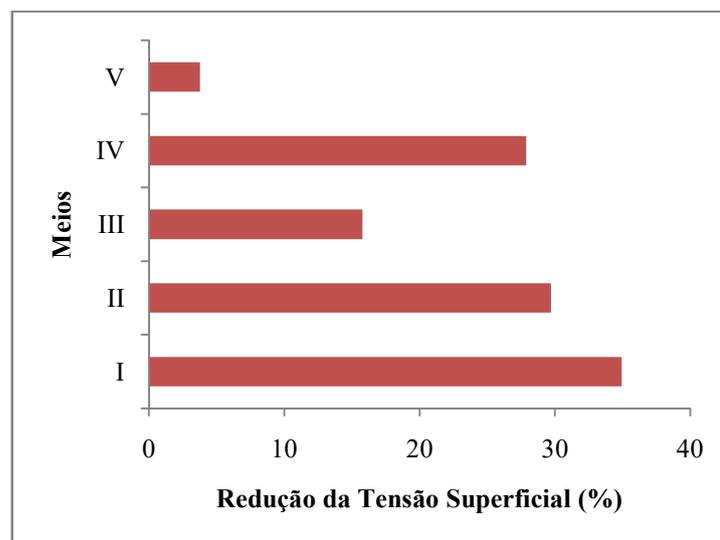
Meio II – extrato de levedura + NaCl

Meio III – sulfato de amônia + NaCl

Meio IV- citato de amônia + NaCl

Meio V – nitrato de amônia + NaCl

Figura 9. Média da Redução da Tensão Superficial como Índice de Avaliação da Produção de Biossurfactantes nos substratos testados.



O *Bacillus subtilis* é um microrganismo bastante utilizado para produção de biossurfactantes devido sua alta capacidade de redução da tensão superficial. Dados em literatura apontam que a surfactina, surfactante natural produzido por este microrganismo, tem

a capacidade de diminuir a tensão superficial da água (72 mN/m) para valores entre 47 e 27 mN/m (Silva *et al.*, 2016).

Estudos com substratos renováveis são considerados promissores quando se tem uma redução acima de 25%, havendo a necessidade de adaptação do meio e condições de fermentação, a fim de se obter melhores resultados, em busca de valores próximos aos obtidos com substratos comerciais e até mesmo com surfactantes sintéticos.

A produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* também foi avaliada utilizando água residual de mandioca, obtida através da prensagem da raiz, como substrato. Os resultados mostraram uma redução da tensão superficial de 52 mN/m para 33 mN/m em 12 horas de fermentação (Barros *et al.*, 2008).

Ehrhardt (2015) também avaliou a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando o resíduo do abacaxi como substrato. Suas análises foram realizadas apenas com o caldo do abacaxi acrescido de diferentes concentrações de glicose e obteve uma redução máxima de 25% na tensão superficial quando adicionado 5% de glicose ao caldo do abacaxi.

Outro estudo, realizado por Santos *et al.* (2015) buscou identificar o processo ótimo para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando diferentes resíduos como substrato – glicerina, água de processamento de batatas, maceração de milho e óleo de fritura. Seus resultados reduziram a tensão superficial de 71 mN/m para 31 mN/m.

Outro estudo avaliou a produção dos surfactantes naturais produzidos por *Bacillus subtilis* em substrato composto por casca de mamão obtendo 32,5% de redução na tensão superficial após 24 horas de fermentação (Soares *et al.*, 2018).

Ferrassoli (2019) avaliou a produção de biossurfactantes por *Candida tropicalis* utilizando talo de abacaxi enriquecido com diferentes concentrações de glicose e obteve uma tensão superficial de 28 mN/m na concentração de 4%.

4.2.2 Índice de Emulsão

A capacidade de emulsificação dos biossurfactantes é bastante explorada uma vez que garante a esses compostos uma ampla aplicabilidade em diferentes áreas industriais. Como já mencionado, diferentes microrganismos em diferentes condições de fermentação resultam em biossurfactantes com características e quantidade distintas. Com isso, as propriedades desses compostos também variam. Um composto com uma boa atividade superficial e interfacial, por

exemplo, pode não apresentar rendimentos igualmente favoráveis de índice de emulsão, ou vice-versa.

A análise de índice de emulsão foi realizada através da proporção óleo/biossurfactante, utilizando óleo de soja. Em tubos graduados foram adicionados 1mL de óleo e 1mL do biossurfactante produzido, agitado em vórtex por 1 minuto e deixado em repouso por 24 horas. Os resultados, apresentados na tabela 11, indicaram bons índices para os meios I, II, III e IV. Não foi observada presença de camada de emulsão após análise com o meio V, demonstrando, assim como na análise de tensão superficial, que as condições impostas neste meio não foram favoráveis à produção de biossurfactante. O melhor resultado foi denotado pelo meio I, com um índice de 51,98%, seguido pelo meio III com 50,00%.

Tabela 11. Avaliação da Produção de Biossurfactante através do Índice de Emulsão, de acordo com a proporção óleo/biossurfactante, em cinco diferentes meios testados.

| Meio | Índice Obtido após 24h de Repouso |
|------|-----------------------------------|
| I | 51,98% ± 0,03% |
| II | 44,83% ± 0,01% |
| III | 50,00% ± 0,01% |
| IV | 34,78% ± 0,02% |
| V | ----- |

----- Não houve emulsificação do meio

Meio I – peptona + NaCl
 Meio II – extrato de levedura + NaCl
 Meio III – sulfato de amônia + NaCl
 Meio IV- citato de amônia + NaCl
 Meio V – nitrato de amônia + NaCl

Costa (2005) estudou a capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* utilizando Manipueira como substrato. Dos diferentes óleos testados, podemos destacar o índice de 74% obtido quando em presença de óleo de soja.

A atividade emulsificante também foi avaliada por Ehrhardt (2015) após produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando o resíduo do abacaxi como substrato. Em tal estudo foram avaliados dois óleos: óleo de soja e de motor. A pesquisa apresentou resultados semelhantes ao presente nesse trabalho com um índice de emulsão máximo de 52,9% com óleo de soja e 68% com óleo de motor.

Sousa (2016) avaliou a produção de biossurfactantes por leveduras provenientes da Antártica e avaliou a capacidade emulsificante com óleo de soja, óleo de motor, querosene e óleo diesel. Os resultados foram bastante favoráveis para todos os óleos testados com índices

próximos a 100%. Porém, o mesmo trabalho avaliou a capacidade de redução da tensão superficial e obteve baixas porcentagens de redução.

Diversos trabalhos, como o de Cai *et al.* (2014) avaliaram a capacidade de produção de biossurfactante através das análises de tensão superficial e índice de emulsão e confirmaram que a diminuição da tensão superficial e a propriedade emulsificante não são, necessariamente, correlacionadas, ou seja, um determinado biossurfactante pode apresentar excelentes resultados em sua atividade superficial e interfacial e não obter altos índices de emulsão, ou vice-versa.

Rocha (2017) em seu estudo na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando melão de cana como substrato, obteve um índice de emulsão (%) de $59,03 \pm 1,3$ em querosene.

4.2.3 Biomassa e Colapso da Gota

Para que haja produção de biossurfactante faz-se necessário o desenvolvimento e multiplicação do microrganismo no meio testado. Desta forma, a massa seca foi avaliada a fim de se comprovar o crescimento celular nos meios testados, conforme apresentado na tabela 12. Os valores indicam um maior crescimento nos meios I (contendo peptona), II (com extrato de levedura) e IV (contendo citrato de amônia), um crescimento menos expressivo no meio III, com sulfato de amônia, e um desenvolvimento mínimo no meio V, contendo nitrato de amônia.

Tabela 12. Resultados para massa seca e colapso da gota para os cinco meios analisados.

| | Meio I | Meio II | Meio III | Meio IV | Meio V |
|------------------|--------|---------|----------|---------|--------|
| Massa seca (g/L) | 2,0532 | 1,4505 | 0,3397 | 1,2880 | 0,0198 |
| Colapso da Gota | + | - | - | + | - |

+ ocorreu colapso da gota

- não ocorreu colapso da gota

A tabela acima também apresenta resultados do ensaio de colapso da gota. Trata-se de uma análise qualitativa indicativa da produção de biossurfactante. O resultado foi positivo apenas para os meios I e IV.

4.3 Processo Fermentativo B

4.3.1 Planejamento Experimental I

A escolha do substrato para desenvolvimento do microrganismo é de extrema importância quando se busca altos rendimentos na produção de biossurfactantes.

A adição de compostos que elevem o teor nutricional do meio, normalmente, traz benefícios à produção. Saber escolher os aditivos nutricionais e suas quantidades irá interferir na qualidade e quantidade do biossurfactante produzido. É importante considerar, entretanto, o valor econômico agregado a estes complementos, uma vez buscamos reduzir os custos de produção ao se utilizar de substratos renováveis para a produção.

O ideal é encontrar um substrato renovável que contenha a maior quantidade de nutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismos resultando em um melhor rendimento, sem a necessidade de adicionar diferentes compostos e em altas quantidades.

Desta forma, foi realizado um planejamento experimental 2^3 com 4 pontos centrais, adicionando glicose no meio com o objetivo de avaliar a necessidade de enriquecimento do meio. A resposta medida foi a tensão superficial e as figura de 10 a 17 representam os resultados obtidos através do *software Statistica (v. 10)*.

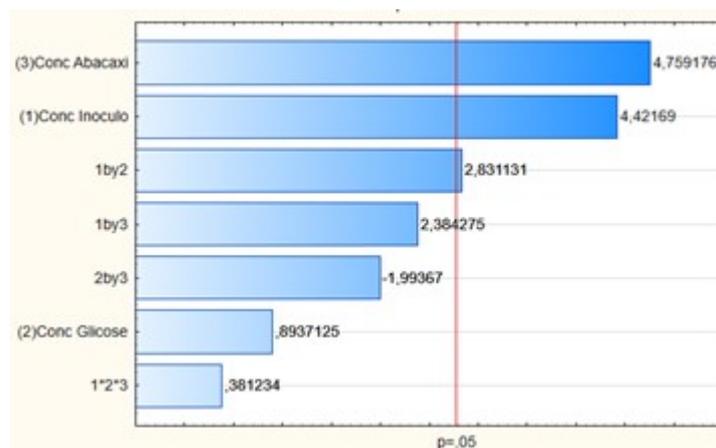
Em um primeiro momento, na figura 10, observando os efeitos significativos podemos avaliar o p-valor, obtido pelo nível de confiança de 95% e verificar que o fator concentração de glicose e as interações inóculo-glicose, glicose-abacaxi e inóculo-glicose-abacaxi foram considerados não significativos, por apresentarem p-valor maior que 0,05.

Figura 10. Efeitos estimados obtidos no Planejamento Experimental 1, (Fonte: produzido pela autora utilizando software Statistica v.10)

| Factor | Effect | Std.Err. | t(4) | p | -95, % Cnf.Limt | +95, % Cnf.Limt | Coeff. | Std.Err. Coeff. | -95, % Cnf.Limt | +95, % Cnf.Limt |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|--------------------|--------------------|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Mean/Interc. | 18,85333 | 0,653225 | 28,86194 | 0,000009 | 17,03969 | 20,66698 | 18,85333 | 0,653225 | 17,03969 | 20,66698 |
| (1)Conc Inoculo | 7,07500 | 1,600067 | 4,42169 | 0,011496 | 2,63250 | 11,51750 | 3,53750 | 0,800034 | 1,31625 | 5,75875 |
| (2)Conc Glicose | 1,43000 | 1,600067 | 0,89371 | 0,421988 | -3,01250 | 5,87250 | 0,71500 | 0,800034 | -1,50625 | 2,93625 |
| (3)Conc Abacaxi | 7,61500 | 1,600067 | 4,75918 | 0,008911 | 3,17250 | 12,05750 | 3,80750 | 0,800034 | 1,58625 | 6,02875 |
| 1 by 2 | 4,53000 | 1,600067 | 2,83113 | 0,047291 | 0,08750 | 8,97250 | 2,26500 | 0,800034 | 0,04375 | 4,48625 |
| 1 by 3 | 3,81500 | 1,600067 | 2,38428 | 0,075637 | -0,62750 | 8,25750 | 1,90750 | 0,800034 | -0,31375 | 4,12875 |
| 2 by 3 | -3,19000 | 1,600067 | -1,99367 | 0,116960 | -7,63250 | 1,25250 | -1,59500 | 0,800034 | -3,81625 | 0,62625 |
| 1*2*3 | 0,61000 | 1,600067 | 0,38123 | 0,722414 | -3,83250 | 5,05250 | 0,30500 | 0,800034 | -1,91625 | 2,52625 |

O gráfico de Pareto (figura 11) também evidencia a concentração de glicose e as interações a ela relacionada como fatores não significativos, podendo estes serem eliminados em experimentos futuros.

Figura 11. Pareto dos Efeitos com limiar de significância de 0,05 obtido no planejamento experimental 1 (Fonte: produzido pela autora utilizando software Statistica v.10)



Avaliando os efeitos dois a dois através das superfícies de resposta e gráficos lineares, os resultados que tornam a concentração de glicose um fator não significativo tornam-se mais evidentes. Ao observarmos as figuras 12 e 13 da correlação entre concentração de glicose e concentração de inóculo, podemos verificar que valores altos de glicose, porém com a menor concentração de inóculo não há uma grande redução da tensão superficial e o aumento de glicose, junto com o aumento da quantidade de inóculo resulta em maiores reduções da tensão.

Figura 12. Superfície de Resposta - Concentração Glicose x Concentração Inóculo – obtida no planejamento experimental 1.

Figura 13. Superfície de Resposta - Concentração Glicose x Concentração Inóculo – obtida no planejamento experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).

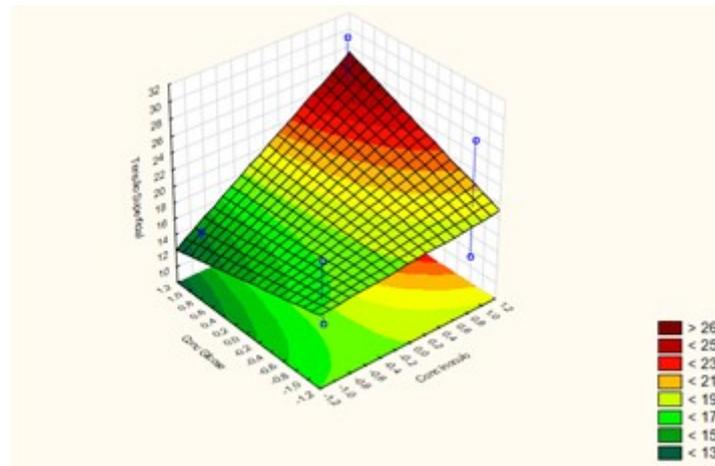
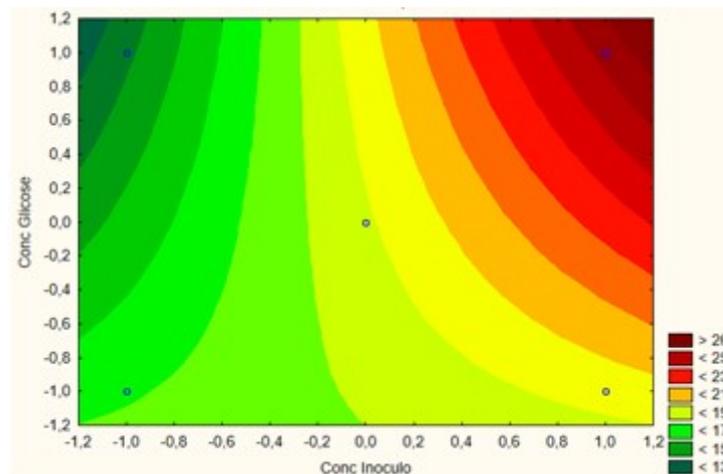


Figura 14. Curvas de Nível - Concentração Glicose X Concentração de Inóculo – obtidas no Planejamento Experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).



As figuras 14 e 15 representam a correlação entre a concentração de abacaxi e a concentração de inóculo. Nestas, é possível observar um aumento gradual da redução da tensão quando se aumenta tanto a concentração de inóculo quanto a concentração de resíduo de abacaxi, o que nos leva a concluir que o microrganismo está consumindo os nutrientes presentes no abacaxi para o seu desenvolvimento e quanto mais se aumenta a quantidade de inóculo no meio, mais resíduo é necessário para suprir o *Bacillus*.

Figura 15. Superfície de Resposta Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo
(Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).

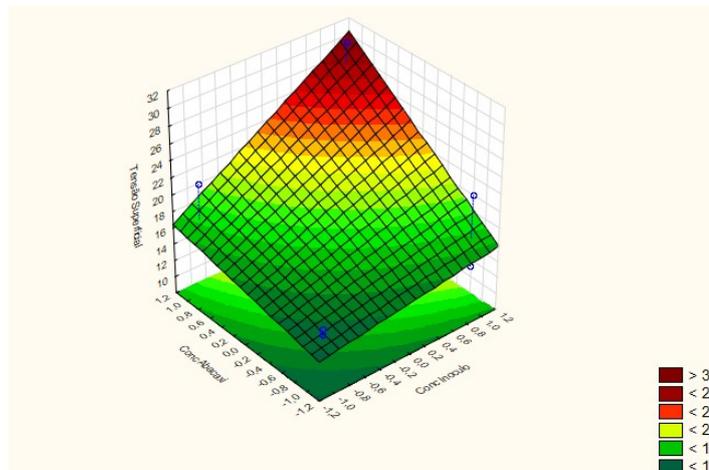
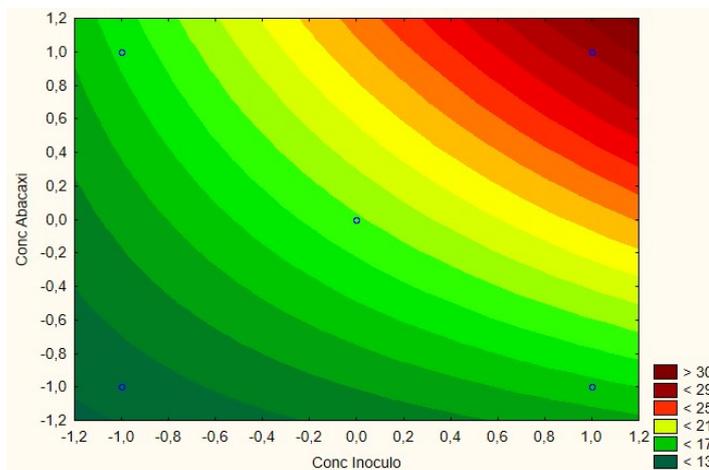


Figura 16. Curvas de Nível - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo – obtidas no Planejamento Experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).



Por fim, quando se observa as figuras 16 e 17 indicativas da relação entre a concentração de resíduo de abacaxi e a concentração de glicose, nota-se que em altas quantidades de resíduo, porém com a menor concentração de glicose, temos o melhor rendimento, evidenciando que os componentes presentes no resíduo de abacaxi são o suficiente para atender as necessidades nutricionais do *Bacillus*, produzindo biossurfactantes e reduzindo a tensão superficial.

Figura 17. Superfície de Resposta - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Glicose – obtida no planejamento experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).

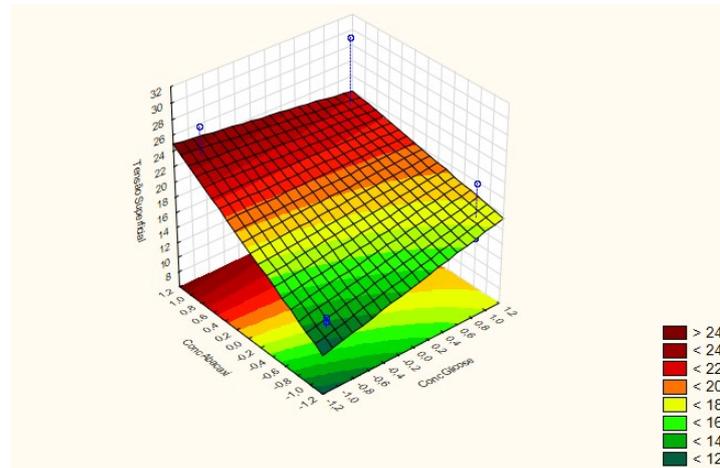
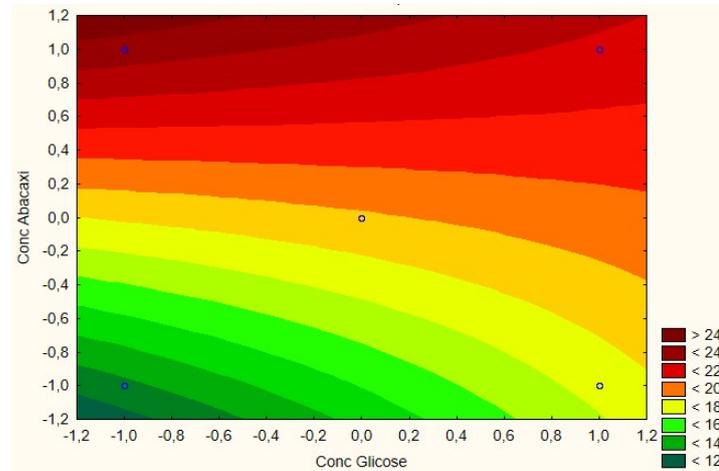


Figura 18. Curvas de Nível - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Glicose – obtidas no planejamento experimental 1 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).



4.4 Processo Fermentativo C

4.4.1 Planejamento Experimental II

Ao eliminar os fatores não significativos anteriormente observados, realizou-se um segundo planejamento experimental 2^2 com 4 pontos centrais, agora apenas com a

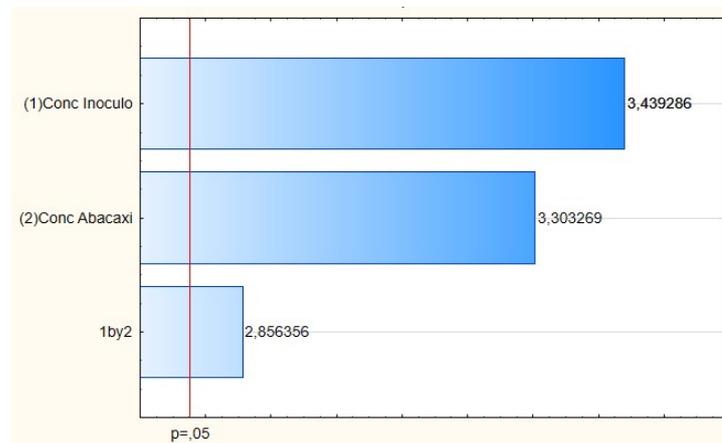
concentração de inóculo e concentração de resíduo de abacaxi como variáveis (figuras 18 a 21).

A figura 18 apresenta os efeitos estimados, no qual se observa, através do p-valor que todos os fatores agora são considerados significativos, com um nível de confiança de 95%. Da mesma forma, o gráfico de Pareto (figura 19) aponta os dois fatores: concentração de inóculo e concentração de resíduo de abacaxi, assim como a interação inóculo-abacaxi, como significativos.

Figura 19. Efeitos estimados - Planejamento Experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).

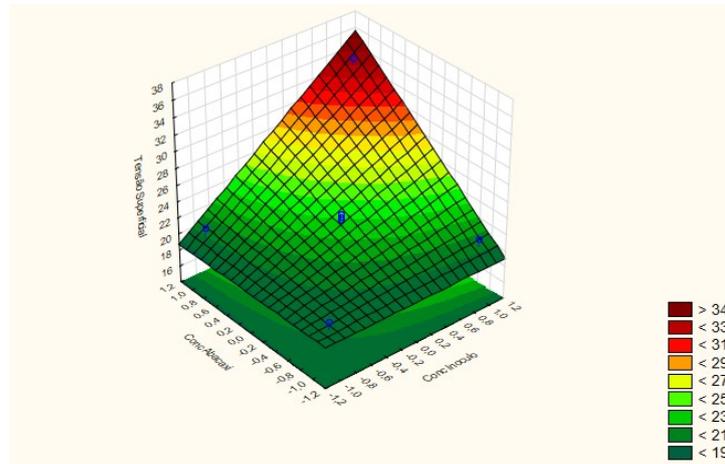
| Factor | Effect | Std.Err. | t(4) | p | -95,% Cnf.Limt | +95,% Cnf.Limt | Coeff. | Std.Err. Coeff. | -95,% Cnf.Limt | +95,% Cnf.Limt |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|-------------------|-------------------|----------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Mean/Interc. | 23,11625 | 0,727813 | 31,76124 | 0,000006 | 21,09552 | 25,13698 | 23,11625 | 0,727813 | 21,09552 | 25,13698 |
| (1)Conc Inoculo | 7,08000 | 2,058567 | 3,43929 | 0,026311 | 1,36450 | 12,79550 | 3,54000 | 1,029283 | 0,68225 | 6,39775 |
| (2)Conc Abacaxi | 6,80000 | 2,058567 | 3,30327 | 0,029842 | 1,08450 | 12,51550 | 3,40000 | 1,029283 | 0,54225 | 6,25775 |
| 1 by 2 | 5,88000 | 2,058567 | 2,85636 | 0,046099 | 0,16450 | 11,59550 | 2,94000 | 1,029283 | 0,08225 | 5,79775 |

Figura 20. Pareto dos Efeitos com limiar de significância de 0,05, obtido no planejamento experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).



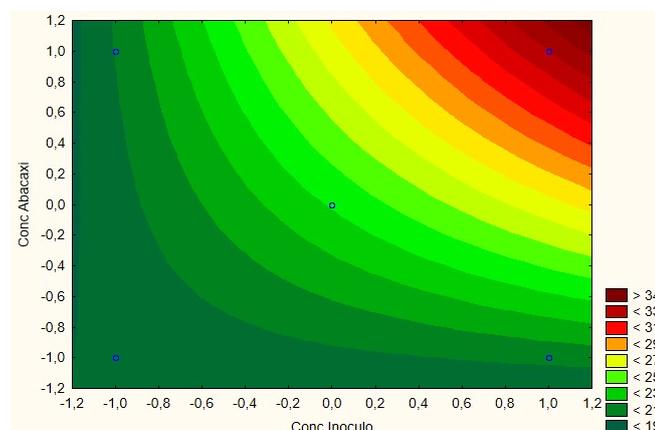
Assim como no planejamento experimental 1, a superfície de resposta e as curvas de nível da interação entre a concentração de resíduo do abacaxi e a concentração de inóculo foram avaliadas e denotaram que o maior rendimento, ou seja, o melhor resultado na redução da tensão superficial foi quando se utilizou a maior concentração de resíduo e a maior concentração de inóculo.

Figura 21. Superfície de Resposta - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo – obtida no planejamento experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).



Os resultados menos favoráveis, com redução da tensão em torno de 20%, foram obtidos quando se trabalhou com baixa concentração de inóculo e baixa quantidade de resíduo. O consumo dos nutrientes da casca do abacaxi, portanto, foi aumentando conforme se aumentou a concentração de inóculo, o que demonstra que a composição de açúcares e demais nutrientes presentes no resíduo são suficientes para garantir o *Bacillus*, garantir seu desenvolvimento e, conseqüentemente, produzir biossurfactantes.

Figura 22. Curvas de Nível - Concentração Resíduo de Abacaxi x Concentração Inóculo – obtidas no planejamento experimental 2 (Fonte: produzida pela autora utilizando software Statista v.10).



Estudos realizados por Secato *et al.* (2016) mostraram a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduos industriais como substrato e avaliaram três diferentes

concentrações de inóculo (5%, 7,5% e 10%). Os melhores resultados foram obtidos com a máxima concentração de inóculo, com uma redução de 70mN/m para 44mN/ m. As demais concentrações apresentaram resultados inferiores, com 14% de redução quando se utilizado 5% de inóculo e 20% de redução para a fermentação com 7,5% de inóculo.

Almeida (2015) realizou um estudo de otimização das condições de cultivo de *Pantoea sp.* para produção de biossurfactantes através de análises estatísticas e avaliação de superfícies de resposta. Foram avaliadas três variáveis: gordura vegetal, caldo da casca do abacaxi e milhocina. A condição ótima de produção foi obtida com o meio contendo 2% de gordura vegetal, 5% de milhocina e 25% de resíduo de abacaxi, com redução da tensão superficial em 56,93%.

Outro trabalho, apresentado por Nagy (2018), avaliou diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biossurfactante de baixo custo com resíduos agroindustriais, utilizando caldo de caju. Após planejamentos experimentais, obteve máximo rendimento com a composição de extrato de caju, extrato de levedura e citrato de amônio, com valor de tensão superficial de 54,87 mN/m.

4.5 Processo Fermentativo D

4.5.1 Tensão Superficial – ponto a ponto

A avaliação de diferentes meios e, posteriormente, análises estatísticas com alteração nas concentrações de componentes presentes no melhor substrato, resultaram na obtenção de uma composição considerada ótima para o desenvolvimento do *Bacillus subtilis*.

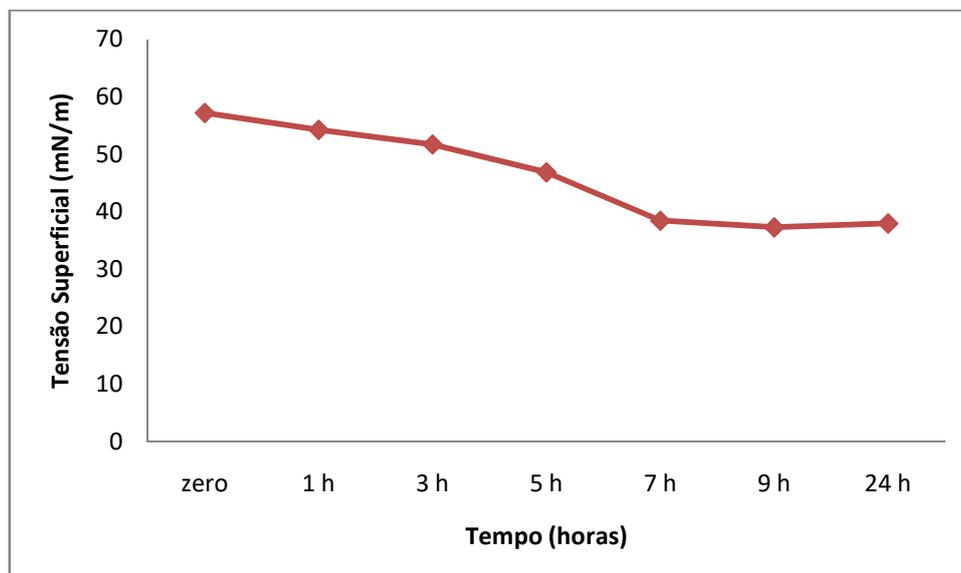
A tabela 13 apresenta a composição do meio ótimo e as condições de fermentação trabalhadas para a análise da tensão superficial ponto a ponto, testes de estabilidade e aplicação do biossurfactante.

Tabela 13. Composição do meio ótimo e condições de fermentação para análises de tensão superficial, testes de estabilidade e aplicação do biossurfactante.

| | Composição | Temperatura | Agitação | Tempo de Fermentação |
|-------------------|---|-------------|----------|----------------------|
| Meio ótimo | 0,76g de peptona + 0,06g NaCl + 95mL de resíduo de abacaxi + 15% de inoculo | 37°C | 150 rpm | 24 horas |

A primeira análise realizada foi a de tensão superficial, considerando a retirada de sete pontos durante um período de 24 horas para avaliação da queda da tensão superficial ao longo do tempo (figura 22). Observa-se uma redução gradual ao longo das sete primeiras horas de fermentação, após esse período a tensão estabilizou próximo à 40mN/m, atingindo o máximo de redução após 9 horas (37,29mN/m), com uma redução total de 34,78%.

Figura 23. Avaliação da Produção de Biossurfactante através da Redução da Tensão Superficial – Análise ponto a ponto, por 24 horas.



Sousa *et al.* (2014) pesquisaram a produção de surfactantes naturais a partir de *Bacillus subtilis* quando fermentado em glicerol bruto oriundo do biodiesel. O processo

fermentativo de 72 horas, resultou em uma redução da tensão para 31,5mN/m, com valor inicial próximo à 50mN/m.

Como já mencionado, a mudança de substrato e condições de fermentação influenciam diretamente na produção do biossurfactante, mesmo que se utilizando o mesmo microrganismo para produção. Nitschke (2004) alcançou valores próximos a 45% de redução da tensão superficial quando avaliada a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato.

4.5.2 Teste de Estabilidade

Os estudos voltados à produção de biossurfactantes visam demonstrar sua capacidade em substituir os surfactantes sintéticos, uma vez que são compostos menos tóxicos e biodegradáveis. As inúmeras pesquisas realizadas estão voltadas a justificar o uso dos tensoativos naturais e assim torná-los competitivos no mercado. Uma das vantagens que os biossurfactantes apresentam é sua capacidade em se manter estável em condições extremas, o que é de grande valia para indústrias, principalmente para as que trabalham em circunstâncias adversas.

É de conhecimento, entretanto, que os microrganismos produtores e suas diferentes linhagens tendem a apresentar comportamentos distintos quando impostos a alterações no meio, seja uma mudança na composição, como apresentado neste trabalho com os diferentes meios estudados, ou em uma mudança na temperatura ou pH.

Quando se trata, portanto, do uso de biossurfactante em condições adversas, é importante, primeiramente, avaliar qual microrganismo é o mais adequado para a aplicabilidade desejada, estudar a melhor condição para que este tenha o melhor rendimento e investigar se este permanece estável frente às condições em que será utilizado, garantindo assim um comportamento eficaz constante.

Sendo assim, o biossurfactante produzido neste trabalho foi submetido a três variações para avaliar sua estabilidade: temperatura, pH e salinidade do meio.

Foi realizada uma fermentação no qual se mediu a tensão superficial inicial e final (tabela 14) e, após o período de 24 horas, as amostras para os testes de estabilidade foram coletadas.

Tabela 14. Valores de tensão superficial da amostra em tempo zero e após 24 horas de fermentação.

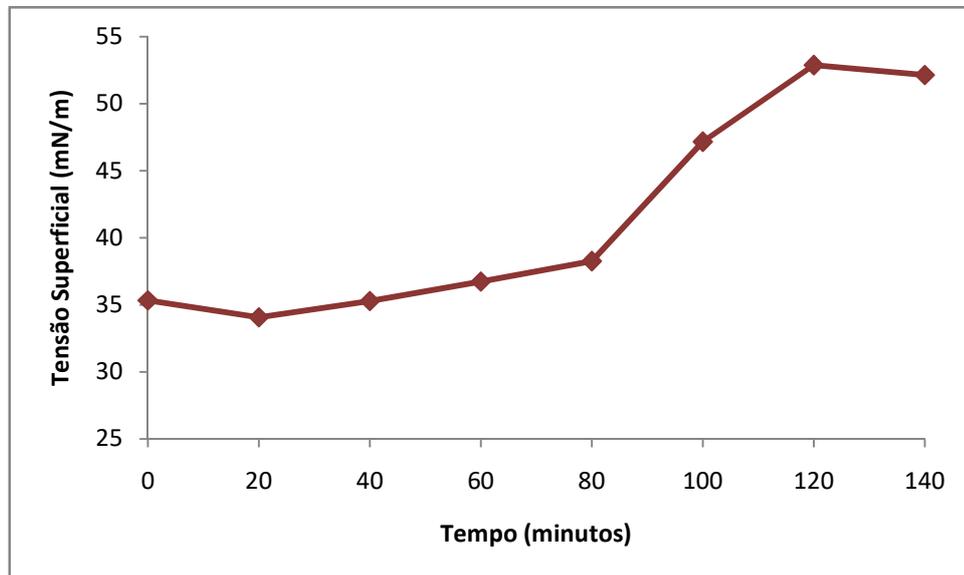
| Tensão Superficial Inicial | Tensão Superficial após 24 horas |
|----------------------------|----------------------------------|
| 54,18 mN/m | 35,79 mN/m |

O processo fermentativo foi realizado na melhor condição estudada neste trabalho, como descrito anteriormente, contendo 95mL de resíduo de abacaxi, 15% de inóculo e enriquecido com peptona, à 37°C e agitação constante de 150rpm.

4.5.2.1 Estabilidade frente à temperatura

A primeira condição adversa avaliada foi a temperatura. Para produção do biossurfactante foi mantida uma temperatura de 37°C, valor ótimo para o desenvolvimento do *Bacillus subtilis*, de acordo com o apresentado em literatura. Após produção, o biossurfactante produzido foi exposto, em um primeiro momento, a uma temperatura de 100°C, por 140 minutos. A cada 20 minutos, uma amostra foi retirada e a tensão superficial novamente medida, comparando o valor obtido com o da tensão após 24 horas de fermentação. A figura 23 apresenta o comportamento do tensoativo ao longo do período. Observa-se que a tensão superficial manteve-se constante nos 60 minutos iniciais, tendo um pequeno aumento a partir de 80 minutos de exposição e aumentando consideravelmente após 100 minutos, chegando próximo ao seu valor inicial (no tempo zero – antes da fermentação) após 120 minutos.

Figura 24. Avaliação da Estabilidade através da Análise de Tensão Superficial após exposição, a uma temperatura de 100°C, do biossurfactante produzido.

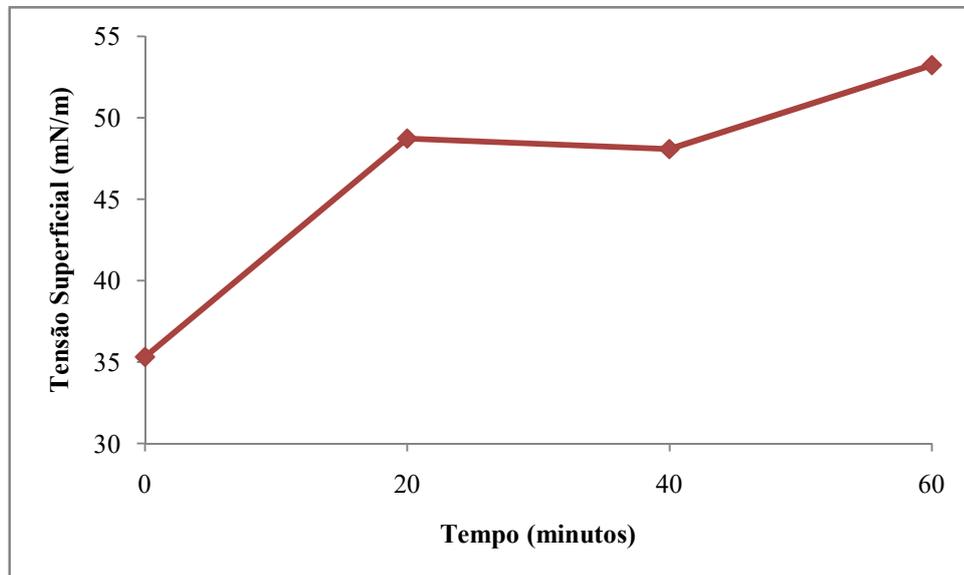


Fica claro, portanto, que o biossurfactante produzido consegue se manter estável por cerca de 1 hora, quando exposto à temperatura de 100°C, perdendo essa sua capacidade após esse período.

Também foi avaliada a estabilidade térmica do surfactante natural quando submetido à temperatura de 121°C, por 60 minutos. Neste estudo, uma amostra foi retirada a cada 20 minutos e novamente avaliada de acordo com a tensão superficial (figura 24).

Diferentemente do observado à 100°C, a tensão superficial começou a aumentar logo nos primeiros 20 minutos de exposição, chegando ao seu valor inicial após 60 minutos, denotando um comportamento instável à 121°C.

Figura 25. Avaliação da Estabilidade através da Análise de Tensão Superficial após exposição, a uma temperatura de 121°C, do biossurfactante produzido.



Costa (2005) reportou a estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Os resultados mostraram que o composto era estável a 100°C por um período de 2 horas. Estudos semelhantes conduzidos por Ghojavand et al. (2008) demonstraram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus* à 100°C por 120 minutos.

4.5.2.2 Estabilidade frente ao pH

O teste de estabilidade em diferentes pHs não apresentou resultados favoráveis para valores acima do pH 6 (tabela 15). Como visto anteriormente, o resíduo do abacaxi apresenta um pH em torno de 3, caracterizando-o como um meio ácido. O desenvolvimento do microrganismo nesse meio expressa uma tendência do *Bacillus*, dentro das demais condições impostas, em preferir substratos com pH mais baixo. Isso foi comprovado quando se investigou a estabilidade frente ao pH, adicionando ao biossurfactante diferentes soluções com pH variando de 4 à 8, em uma proporção 1:1.

Tabela 15. Avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido, através da análise de tensão superficial, após adição de soluções com pH na faixa de 4.0 a 8.0.

| pH | Tensão Superficial mN/m |
|-----|-------------------------|
| 4.0 | 34,99 |
| 5.0 | 38,21 |
| 6.0 | 48,76 |
| 7.0 | 54,21 |
| 8.0 | 53,85 |

Para análise utilizou-se amostras da fermentação anteriormente descrita, cuja tensão superficial, após 24 horas foi de 35,79 mN/m. Tendo em vista esse valor, os resultados apontam que partir do pH 5.0 já é possível notar um pequeno aumento da tensão, que se torna mais evidente com o pH 6.0, chegando próximo ao valor inicial de tensão (54,18 mN/m) quando em contato com as soluções de pH 7.0 e 8.0.

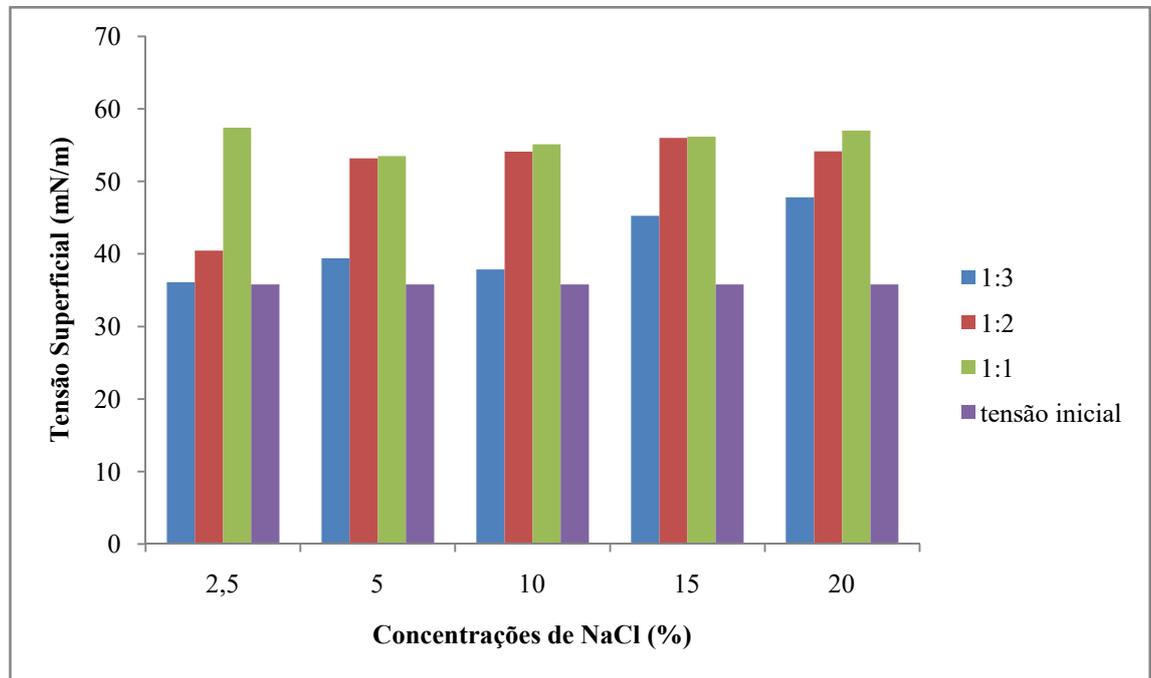
Resultados semelhantes foram observados por Kim *et al.* (1997) e Ehrhardt (2015). Estudos sugerem que a instabilidade em meios alcalinos está relacionada com uma possível precipitação do biossurfactantes quando expostos ao pH básico.

4.5.2.3 Estabilidade frente à força iônica

O biossurfactante também foi avaliado em relação a sua estabilidade quando exposto a soluções salinas em diferentes concentrações.

A figura 25 apresenta os resultados de tensão superficial obtidos após adição de NaCl nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:3 (solução salina : biossurfactante), respectivamente.

Figura 26. Avaliação da Estabilidade do Biossurfactante produzido através da análise de Tensão Superficial após adição de solução de NaCl em diferentes concentrações.



Pesquisas realizadas por Vaz *et al.* (2012) se mostraram favoráveis quanto à estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* quando expostos à soluções salinas nas concentrações de 2 a 15%. Já Almeida (2015) avaliou a estabilidade do surfactante natural produzido por *Pantoea sp.* frente à soluções salinas com concentrações variando de 2-50%. Os resultados mostraram que a tensão superficial se manteve constante até a 8% de NaCl, apresentando um pequeno aumento nas concentrações de 10, 15 e 20%. O biossurfactante não se manteve estável nas concentrações mais altas (30, 40 e 50%).

4.5.3 Caracterização Iônica

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua estrutura química e origem microbiana (Faria, 2010). O mais comum produzido pelo gênero *Bacillus* é a surfactina. Trata-se de um lipopeptídeo formado pela ligação de um grupo proteico a uma cadeia de ácidos graxos, sendo que o primeiro pode estar na forma aniônica ou neutra e os aminoácidos estão normalmente arranjados em uma estrutura cíclica (Maier, 2003).

Na análise de caracterização iônica foi possível observar linhas de precipitação entre os poços contendo o biossurfactante e os contendo cloreto de bário (composto catiônico), enquanto não houve a formação de linhas entre o biossurfactante e o composto aniônico SDS.

Desta forma, a técnica de dupla difusão em ágar demonstrou o caráter aniônico do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*.

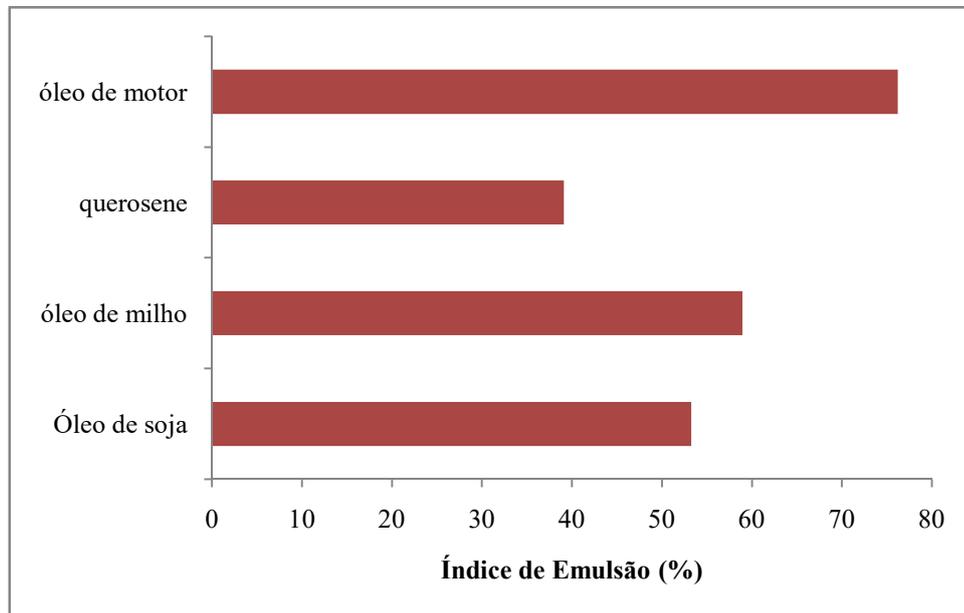
4.5.4 Aplicação

A capacidade de formar emulsão foi avaliada testando-se quatro diferentes hidrocarbonetos. Os resultados apresentados, na tabela 16 e figura 26, indicam que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* apresenta, de modo geral, uma boa atividade emulsificante, com exceção do teste com a querosene que os valores obtidos foram abaixo de 40%. Os índices obtidos para óleo de soja e óleo de milho são indicativos de uma potencial utilização do biossurfactante na indústria de alimentos e agente de limpeza. O melhor índice, obtido com o óleo de motor, sugere uma possível aplicação desses compostos em solos contaminados pelo vazamento desse tipo de óleo.

Tabela 16. Atividade emulsificante do biossurfactante produzido avaliando quatro diferentes hidrocarbonetos.

| Hidrocarboneto | Índice de Emulsão |
|----------------|-------------------|
| Óleo de Soja | 53,27% |
| Óleo de Milho | 58,94% |
| Querosene | 39,11% |
| Óleo de Motor | 76,23% |

Figura 27. Atividade emulsificante do biossurfactante produzido, avaliando quatro hidrocarbonetos.



Como já citado em diferentes momentos, a qualidade e quantidade do biossurfactante produzido irá depender das condições de fermentação, meio de cultivo e do microrganismo utilizado. As diferenças na produção resultam em surfactantes com estruturas diferentes. A estrutura do biossurfactante está diretamente relacionada com o tipo de emulsão que será formada, ou seja, a proporção entre as porções lipofílicas e hidrofílicas presentes na molécula, expressadas pelo balanço hidrofílico-lipofílico (HBL), indicarão se o composto irá formar uma emulsão do tipo óleo/água ou água/óleo (Desai e Banat, 1997).

Banat (1993) estudou a capacidade de emulsificação de um surfactante natural produzido por uma cepa de *Bacillus* termofílica, quando fermentada em um meio nutriente. Os resultados mostraram que o biossurfactante foi capaz de emulsionar querosene eficientemente, com um índice de 95%.

Outro estudo semelhante avaliou a atividade emulsificante de um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* com substrato de manipueira. Foram testados 10 diferentes hidrocarbonetos, todos com valores acima de 65%, sendo que o índice obtido com óleo de soja foi de 74% e o com querosene de 70,4%. Este estudo não avaliou a capacidade emulsificante em óleo de motor e em óleo de milho (Nitschke, 2004).

Abouseoud *et al.* (2007) pesquisaram biossurfactantes a partir de azeite de oliva por *Pseudomonas fluorescens* e avaliaram sua atividade emulsificante com óleo diesel, querosene

heptano e óleo de girassol. Os resultados variaram de 45 a 55%, sendo o melhor para óleo diesel e o valor mais baixo para o óleo de girassol.

Faria (2010) reportou a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *Bacillus sp* quando cultivado em glicerina destilada e obtve resultados próximos aos obtidos neste estudo quando se avaliado índice de emulsão com querosene, com o valor de 33%. O mesmo estudo foi realizado por Reis *et al.* (2004), que encontrou um índice de 40% para querosene quando se utilizado biossurfactante prozudido por *Bacillus subtilis* cultivado e glicerol.

Maia (2017) estudou a produção de biossurfactantes por *Bacillus* através de fermentação submersa em manipueira e avaliou a capacidade de emulsificação com os óleos de soja, soja após fritura, milho, canola, óleo queimado de motor, azeite, querosene e diesel. Os resultados apresentaram valores na faixa de 50 a 65% para os óleos de soja, milho e canola. Com querosene o índice foi de 40% e os melhores resultados foram com azeite (90%) e óleo de motor queimado (95%). A análise não obserevou presença de emulsão com óleo diesel.

Treze diferentes substratos orgânicos foram avaliados por Argentin (2016) na aplicabilidade através da capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por uma linhagem termofílica de *Bacillus*, dos quais podemos descartar o dicloroetano e o tolueno, cujos índices chegaram próximos a 70% e o óleo de motor, com índice de 50%, valor abaixo do encontrado no presente estudo.

Os diferentes estudos em relação à possibilidade de se utilizar biossurfatcantes como agentes emulsificantes indicam, novamente, que a capacidade de emulsão do composto produzido irá variar de acordo com o microrganismo produtor e as condições a ele impostas para desenvolvimento, havendo a necessidade de avaliar diferentes composições para obtenção da atividade ótima.

5 CONCLUSÃO

O trabalho permitiu confirmar a possibilidade de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do abacaxi como substrato, explanando as propriedades presentes no resíduo que permitem essa produção. Os altos teores de açúcares presentes na casca da fruta, bem como outros componentes como lipídios, proteínas, ferro e fósforo comprovaram ser características favoráveis ao desenvolvimento do microrganismo.

Ademais, as variações de composição do meio, com adição de mais fontes de carbono e nitrogênio, avaliando o desempenho da bactéria na produção de biossurfactantes, possibilitaram alcançar bons rendimentos e otimizar o substrato com o intuito de minimizar os custos e viabilizar a produção.

Com resultados superiores a 30% de redução da tensão superficial e a capacidade de emulsificar óleos e gorduras foi possível também avaliar possibilidades de aplicação, havendo a necessidade de desenvolver mais pesquisas voltadas as diferentes aplicabilidades do biossurfactante produzido.

Os testes de estabilidade mostraram-se, em parte, favoráveis. Com essas análises é possível direcionar as áreas em que se é possível trabalhar com esse tipo de biossurfactante e, assim, trabalhar no desenvolvimento de técnicas para produção em maior escala.

O estudo com surfactantes naturais é uma área promissora e com muitas vertentes a serem pesquisas em busca de encontrar espaço no mercado industrial para seu desenvolvimento, utilização e substituição dos tensoativos químicos que ainda são bastante aplicados.

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Aprimorar a técnica de purificação.
- Realizar a identificação do biossurfactante produzido através da técnica de infravermelho.
- Avaliar outras possibilidades de aplicação do biossurfactante produzido.
- Avaliar a possibilidade de produção em maior escala, com a utilização de biorreatores.
- Realizar análise econômica.

7 REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, G.M.F.; HOLSCHUH, H.J.; BORA, P.S.; OLIVEIRA, E.F. Extração, Atividade da Bromelina e Análise de Alguns Parâmetros Químicos em Cultivo de Abacaxi. **Rev. Bras. Frutic.**, v.31, n.4, p. 1117-1121, 2009.
- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A. Biosurfactant Production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. **Communicating Currant Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 340-347, 2007.
- AL-BAHRY, S.N.; AL-WAHAIBI, Y.M.; ELSHAFIE, A.E.; AL-BEMANI, A.S.; JOSHI, S.J.; AL-MAKHMARI, H.S.; AL-SULAIMANI, H.S. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* B20 using Date Molasses and its Possible Application in Enhanced Oil Recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013.
- ALMEIDA, F.C.G. **Produção de Biosurfactante por *Pantoea sp.* Utilizando Casca de Abacaxi e Milhocina e Aplicação na Biorremediação**. 2015. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.
- AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* B30 and its Application in Enhancing Oil Recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.114, p.324-333, 2014.
- AMANI, H.; SARRAFZADEH, M.H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M.R. Comparative Study of Biosurfactant Producing Bacteria in MEOR Applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.75, p. 209-214, 2010.
- ARGENTIN, M.N. **Produção de Biosurfactantes por uma Linhagem Termofílica de *Bacillus* Isolada de Amostra Rochosa de Reservatório de Petróleo**. 2016. Tese de Mestrado Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, SP.
- BALAN, S.S.; KUMAR, C.G.; JAYALAKSHMI, S. Aneurinifactin, a New Lipopeptide Biosurfactant Produced by a Marine *Aneurinibacillus aneurinilyticus* SBP-11 Isolated from Gulf of Mannar: Purification, Characterization and its Biological Evaluation. **Microbiological Research**, v.194, p.1-9, 2017.
- BANAT, I.M. The Isolation of a Thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* **Biotechnol Lett**, v.15, p. 591-594, 1993.

- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARBIERI, E.; SCHIAVANO, G.F.; SANTI, M.; VALLORANI, L.; CASADEI, L.; GUESCINI, M.; GIOACCHINI, A.M.; RINALDI, L.; STOCCHI, V.; BRANDI, G. Bacterial Diversity of Traditional Fossa (pit) Cheese and its Ripening Environment. **International Dairy Journal**, v.23, p.62-67, 2012.
- BARBOSA, L. C. A. Introdução à Química Orgânica. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades Emulsificantes e Estabilidade do Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* em Manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 979-985, 2008.
- BARROS, F.F.C.; PONEZI, A.N.; PASTORE, G.M. Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a Pilot Scale Using Cassava Wastewater as Substrate. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.35, p.1071-1078, 2008.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical Structure, Surface Properties and Biological Activities of the Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from Soapstock. **Antonie van Leeuwenhek**, v. 85, p. 1-8, 2004.
- BENINCASA, M. ACCORSINI, F.R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**, v.99, p. 3843-3849, 2008.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, v. 27, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.
- BORTOLLATO, J e LORA, J. Avaliação da Composição Centesimal do Abacaxi (*Ananas comosus (L.) merril*) Liofilizado e *in natura*. **Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde**, v. 4, n. 1, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p,248-254, 1976.

CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z.; LIN, W.; CAO, T. Screening of biosurfactante producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine pollution bulletin**, [s.l.], v. 86, p. 402-410, 2014.

CASTIGLIONI, G.L.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Produção de Biosurfactante por *Aspergillus fumigates* Utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

COELHO, D.F. **Purificação de Bromelina dos Resíduos do Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) por Precipitação integrada à Sistema Bifásico Aquoso (PEG/Sulfato de Amônio) não Convencional**. 2012. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R. Synthesis of Biosurfactant in Extreme Conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA JUNIOR, A; TAMBOURGI, E. B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/ammonium sulphate). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, p.1-8, 2012.

COOPER, D.G.; GOLDENBER, B.G. Surface-ative agentes from two *Bacillus* species. **Appl Environ Microbiol.**, v. 53, p. 224-229, 1987.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Appl Environ Microbiol**, v. 47, p. 173-176, 1984.

COSTA, G.A.N. **Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações**. 2005. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

DECESARO, A.; RIGON, M.R.; THOMÉ, A.; COLLA, L.M. Produção de Biossurfactantes por Microrganismos Isolados de Solos Contaminados com Óleo Diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potencial. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 61, n.1, p. 47-64, 1997.

EHRHARDT, D.D. **Produção de Biossurfactantes por *Bacillus subtilis* Utilizando Resíduo do Processamento do Abacaxi como Substrato**. 2015. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.

FAHRAM, A.; GUNJAN, G.; GNANSOUNOU, E.; SANGEETA, N. Biosurfactant Production through *Bacillus* sp MTCC 5877 and its Multifarious Applications in Food Industry. **Bioresource Technology**, v.213, p.262-269, 2016.

FARIA, A.F. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual**. 2010. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.org> accessed in Mar 11, 2019.

FERNANDES, P.L.; RODRIGUES, E.M.; PAIVA, F.R.; AYUPE, B.A.L.; MCINERNEY, M.J.; TÓTOLA, M.R. Biosurfactant, Solvents and Polymer Production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their Application for Enhanced Oil Recovery. **Fuel**, v.180, p.551-557, 2016.

FERRASSOLI, K.P. **Produção de Biossurfactantes por *Candida tropicalis* Utilizando Resíduos do Processamento do Abacaxi (*Ananas comosus*) como Substrato**. 2019. Tese de Mestrado Universidade Estadual Paulista – UNESP, São José do Rio Preto, SP.

GONDIM, J.A.M.; MOURA, M.F.V.; DANTAS, A.S.; MEDEIROS, R.L.S.; SANTOS, K.M. Composição Centesimal e de Minerais em Cascas de Frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, p. 825-827, 2005.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A.K. Production and Properties of a Biosurfactant Obtained from a Member of *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **J Colloid Interface Sci**, v. 324, 2008.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KAPPELI, O.; FLECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* Continuous Culture Biosurfactant Production on Nutritional and Environmental Factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 443 - 448, 1986.

GURJAR, J.; SENGUPTA, B. Production of Surfactin from Rice Mill Polishing Residue by Submerged Fermentation Using *Bacillus subtilis* MTCC 2423. **Bioresource Technology**, v. 189, p.243-249, 2015.

HABA, E.; SPUNY, M.J.; BUSQUETS, M. Screening and Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from Waste Frying Oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

JUSOH, N.; OTHMAN, N.; IDRIS, A.; NASRUDDIN, A. Characterization of liquid pineapple waste as carbon source for production of succinic acid. **Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)**, v. 69, n.4, p. 11–13, 2014.

KIM, H.S.; YOON, B.D.; LEE, C.H.; SUH, H.H.; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.84, p.41-46, 1997.

KRONEMBERGER, F.A. **Produção de Rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em Biorreator com Oxigenação por Contactor de Membranas**. 2007. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, RJ.

LEONEL, S.; LEONEL, M.; SAMPAIO, A.C. Processamento de Frutos de Abacaxizeiro CV Smooth Cayene: Perfil de Açúcares e Ácidos dos Sucos e Composição Nutricional da Farinha das Cascas. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 433-439, 2014.

LI, J.; DENG, M.; WANG, Y.; CHEN, W. Production and Characteristics of Biosurfactant Produced by *Bacillus pseudomycooides* BS6 Utilizing Soybean Oil Waste. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.112, p.72-79, 2016.

LIMA, T.M.S.; PROCÓPIO, L.C.; BRANDÃO, F.D.; CARVALHO, A.M.X.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C. Biodegradability of Bacterial Surfactants. **Biodegradation (Dordrecht)**, v. 102, p.2957-2964, 2010.

LIN, S. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LIU, B.; LIU, J.; JU, M.; LI, X.; YU, Q. Purification and Characterization of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its Application in Remediation of Petroleum Contaminated soil. **Marine Pollution Bulletin**, v.107, p. 46-51, 2016.

LOTFABAD, T.B.; EBADIPOUR, N.; ROOSTAAZAD, R.; PARTOVI, M.; BAHMAEI, M. Two Schemes for Production of Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MR01: applying Residues from Soybean Oil Industry and Silica Sol-gel immobilized cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2017.

MAIA, P.C.V.S. **Produção e Aplicação de Bioemulsificante Isolado de Bacillus subtilis UCP 0146 por Fermentação Submersa em Manipueira**. 2017. Tese de Mestrado Universidade Católica de Pernambuco, Recife, PE.

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

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An Update to the Use of Unconventional Substrates for Biosurfactant Production and their New Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANETTI, L.M. Metabólitos Secundários da Família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885-1897, 2009.

MIRANDA, B.F.C. **Caracterização Físico-Química da Polpa e da Casca do Abacaxi (Ananas comosus (L.) merril) Desidratado por Método Convencional de Secagem em Estufa**. 2015. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Cuiabá, MT.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards Commercial Production of Microbial Surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

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

MULLIGAN, N.C.; GIBBS, F.B. **Biosurfactants: Production, Properties and Applications**. Capítulo Factors Influencing the Economics of Biosurfactants. Marcel Dekker: New York, NY, p. 329-368, 1993.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current science**, v. 94, p. 736-747, 2008.

NAGY, G.M. **Produção de Biossurfactantes de Baixo Custo a partir de Resíduos Agroindustriais**. 2018. Tese de Mestrado Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.O. Biosurfactants in Food Industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactante Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v.25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and Properties of a Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown on Cassava Wastewater. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 36-41, 2006.

NITSCHKE, M. **Produção e Caracterização de Biossurfactante de *Bacillus subtilis* Utilizando Manipueira como Substrato**. 2004. Tese de Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.

PARVEEN, J.; SHAJRAT, M.; Md. ZAHANGIR, A.; WAN, M.F.W.N. Isolation and Selection of New Biosurfactant – Producing Bacteria from Degraded Palm Kernel Cake under Liquid State Fermentation. **Journal of Oleo Science**, v. 63, p. 795 - 804, 2014.

PEREIRA, J.F.B.; GUDIÑA, E.J.; COSTA, R.; VOTORINO, R.; TEIXEIRA, J.A.; COUTINHO, J.A.P.; RODRIGUES, L.R. Optimization and Characterization of Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Isolates Towards Microbial Enhanced Oil Recovery Applications. **Fuel**, v.111, p. 259-268, 2013.

PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A.V. Avaliação Cinética da Produção de Biossurfactantes Bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.

RAHMAN, P.; GAKPE, E. Production, Characterization and Applications of Biosurfactants - Review. **Biotechnology**, v. 7, p. 360-370, 2008.

REIS, F.; SÉRVULO, E.; FRANÇA, F. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 912, p. 113-116, 2004.

ROCHA, P.M. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 Utilizando Melaço de Cana de Açúcar como Substrato**. 2017. Tese de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, RN.

RODRÍGUEZ, D.; GRAJAL-MARTÍN, M.J.; ISIDRÓN, M.; PETIT, S.; HORMAZA, J.I. Polymorphic Microsatellite Markers in Pineapple (*Ananascosmosus* (L.) Merrill). **Scientia Horticulturae**, v. 156, p. 127-130, 2013.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; TAKAKI, G.M.C.; SARUBBO, L.A. Characterization and Properties of the Biosurfactant Produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, p.34-38, 2017.

SAIKIA, R.R.; DEKA, S.; DEKA, M.; BANAT, I.M. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. **Ann Microbiol**, v.62, p.753– 763, 2012.

SANTOS, R.M.; FLAUZINO NETO, W.P.; SILVÉRIO, H.A.; MARTINS, D.F.; DANTAS, N.O.; PASQUINI, D. Cellulose Nanocrystals from Pineapple Leaf, a New Approach for the Reuse of this Agro-Waste. **Industrial Crops and Products**, v.50, p.707-714, 2013.

SANTOS, B.F.; PONEZI, A.N.; FILETI, A.M.F. Strategy for Waste Management in the Production and Application of Biosurfactant through Surface Response Methodology. **Clean Techn Environ Policy**, 2015.

SECATO, J.F.F.; COELHO, D.F.; ROSA, N.G.J.; COSTA, L.D.L.; TAMBOURGI, E.B. Biosurfactant Production Using *Bacillus Subtilis* and Industrial Waste as Substrate. **Chemical Engineering Transactions**, v.49, p.103-108, 2016.

SECATO, J.F.F.; SANTOS, B.F.; PONEZI, A.N.; TAMBOURGI, E.B. Optimization Techniques and Development of Neural Models Applied in Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Using Alternative Substrate. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 8, p.343-360, 2017.

SEN, R. **Biosurfactants**. New York, NY:Springer-Verlag New York, 2010.

SEPÚLVEDA, L.; ROMANÍ, A.; AGUILAR, C.N.; TEIXEIRA, J. Valorization of Pineapple Waste for the Extration of Bioactive Compounds and Glycosides Using Autohydrolysis. **Innovative Food Science end Emergin Technologies**, v.47, p. 38-45, 2018.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel Bioemulsifiers from Microorganisms for Use in Foods. **J Biotechnol**, v.40, p.207-217, 1995.

SILVA, A.S.; VIEIRA, I.M.M.; MOURA, T.M.F.; RUZENE, D.S.; SOUZA, R.R.; SILVA, D.P. Aplicação de Biossurfactantes: Avaliação de Meios de Cultivo a Base de Amido. **VIII SIMPROD. Simpósio de Engenharia de Produção de Sergipe**, 2016.

SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as Substrate for the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.79, p.174-183, 2010.

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J.I.; LOBATO, A.K.C.L. Avaliação da Produção de Biossurfactantes por *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 Utilizando Cascas de Mamão como Substrato. **Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, 2018.

SOUSA, M.; DANTAS, I.T.; FELIX, A.K.N.; SANT'ANA, H.B.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n.2, p. 295-301, 2014.

SOUSA, T.G.C. **Seleção das Leveduras do Gênero *Rhodotorulas* do Ambiente Antártico para a Produção de Biossurfactantes**. 2016. Tese de Mestrado Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M. Surfactants Treatment of Crude Oil Contaminated Soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 456-464, 2004.

VAN DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of Microbial Surfactants. **Biotechnology Acta**, v. 9, p. 241-252, 1991.

VAN OSS, C.J. Specifically Impermeable Precipitate Membranes Formed Through Double Diffusion in Gels: Behavior with Complex Forming and with Simple Systems. **J Colloid Interface Sci**, v. 27, p. 684-690, 1968.

VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Critical Review on Biosurfactant Analysis, Purification and Characterization Using Rhamnolipid as a Model Biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p.389-397, 2017.

VAZ, A. D.; GUDINÃ, J. E.; ALAMEDA, J. E.; TEIXEIRA, A. J.; RODRIGUES, R. L. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p.167–174, 2012.

VELIOGLU, Z.; UREK, R.O. Optimization of Cultural Conditions for Biosurfactant Production by *Pleurotus djamor* in Solid State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.120, n.5, p.526-531, 2015.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J. *Bacillus subtilis* as Cell Factory for Pharmaceutical Proteins: a Biotechnological Approach to Optimize the Host Organism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 299-310, 2004.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Bioreactor Design for Enhanced Carrier-assisted Surfactin Production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochem**, v. 48, 2006.

ZOUARI, R.; MOALLA-REKIK, D.; SAHNOUN, Z.; REBAI, T.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Evaluation of Dermal Wound Healing and *in vitro* Antioxidant Efficiency of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.84, p. 878-891, 2016.