

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR CEPAS BACTERIANAS
CULTIVADAS EM CORANTES SINTÉTICOS

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
**Suelma Aparecida Feijó
Migliorelli**, aprovada pela
Comissão Julgadora em 19 de
setembro de 2003.

Suelma Aparecida Feijó Migliorelli
Química

Campinas, 19 de setembro de 2003.

Lucia R. Durrant
Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
Presidente da Banca

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
Orientadora

2200408942

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de
Alimentos

Campinas - SP
2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	TI UNICAMP
	M588p
V	EX
TOMBO BC	58722
PROC	16-227-09
C	☐
D	☒
PREÇO	11,100
DATA	29-06-04
Nº CPD	

CM00198430-4

BIB ID 317981

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

M588p Migliorelli, Suelma Aparecida Feijó
Produção de biosurfactantes por cepas bacterianas cultivadas
em corantes sintéticos / Suelma Aparecida Feijó Migliorelli. –
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

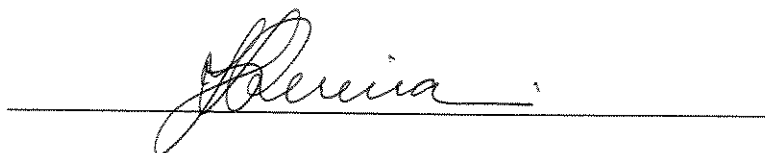
Orientador: Lucia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Corantes. 2.Biosurfactantes. 3.Emulsificação. I.Durrant,
Lucia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III.Título.

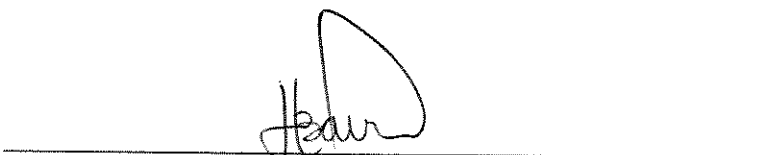
BANCA EXAMINADORA



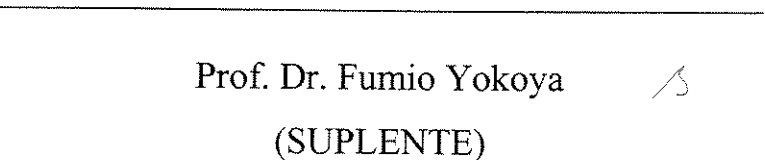
Profª. Dra. Lucia Regina Durrant
(ORIENTADORA)



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(MEMBRO)



Prof. Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti
(MEMBRO)



Prof. Dr. Fumio Yokoya
(SUPLENTE)

*Dedico este trabalho à minha amada família, pela confiança,
incentivo e presença, principalmente nos momentos mais difíceis.*

*Minha filha,
Raquel.*

*Meu marido,
Ricardo.*

*Meus pais,
Olídio e Maria de Lourdes.*

*Meus avós,
Octávio e Olga.*

Obrigada por tornarem minha vida tão feliz!

AGRADECIMENTOS

Ao DEUS UNO E TRINO, que é Pai, Amigo e Companheiro de todas as horas.

À Profa. Dra. Lucia Regina Durrant, orientadora dedicada.

Aos Profs. Drs. José Luiz Pereira, Hamilton Roberto Fortes Bavutti e Fumio Yokoya, pelas valiosas sugestões.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

À Ana Cláudia, pela fundamental colaboração.

A todos os companheiros do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pela paciência, compreensão e carinho.

Aos amigos Hélio, Josemar, Sara, Márcia e Nélida, por tudo de bom que representam.

À Dona Norberta, pela dedicação e amizade tão valiosas.

Aos muito queridos Rosinha, Edna e Edinho, pelo auxílio prestado.

Ao pessoal da Secretaria do DCA, Jardette, Ricardo, Marcão e Marquinho, pela solicitude e carinho.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram no desenvolvimento deste trabalho: **MUITO OBRIGADA!**

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 - INTRODUÇÃO.....	5
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 - Os corantes.....	8
2.1.1 - Características dos Corantes Azo.....	9
2.1.1.1 - Tartrazina.....	11
2.1.1.2 - New Coccine.....	12
2.1.1.3 - Amaranto.....	13
2.1.1.4 - Orange G.....	14
2.1.2 - Características dos triarilmetanos.....	14
2.1.2.1 - Erioglaucine.....	15
2.2 - Biosurfactantes.....	17
2.2.1 - Características estruturais e obtenção de biosurfactantes.....	17
2.2.2 - Propriedades dos surfactantes.....	20
2.3 - Biodegradação e demais métodos de tratamento de águas.....	20
3 - OBJETIVOS.....	24
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 - Introdução.....	25
4.2 - Corantes Artificiais.....	25
4.3 - Microrganismos.....	26
4.4 - Manutenção das cepas bacterianas.....	26
4.5 - Condições de cultivo dos microrganismos	27
4.6 - Corantes artificiais como fonte de carbono.....	28
4.7 - Seleção de microrganismos produtores de alta atividade de emulsificação.....	28
4.7.1 - Atividade de biosurfactante.....	28
4.8 – Estudos realizados com cepas bacterianas selecionadas.....	30
4.8.1 - Determinação da massa bacteriana seca e da variação do pH do meio de cultivo das cepas bacterianas selecionadas.....	31
4.8.2 - Determinação da descoloração dos corantes artificiais pelas cepas bacterianas selecionadas.....	31
4.9 - Identificação das cepas bacterianas selecionadas.....	32
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 - Seleção de microrganismos.....	35
5.1.1 - Determinação das emulsões tipo óleo em água.....	36

5.1.2 - Altura dos halos formados na fase oleosa das emulsões tipo A/O.....	38
5.2 - Experimentos realizados com as cepas bacterianas selecionadas...	43
5.2.1 - Variação da massa seca das cepas bacterianas selecionadas.....	43
5.2.2 - Variação do pH para meios contendo corantes artificiais durante o crescimento das cepas bacterianas selecionadas.....	46
5.2.3 - Determinação de emulsões tipo O/A formadas através do crescimento das cepas bacterianas selecionadas em meio contendo corantes sintéticos.....	48
5.2.4 - Altura dos halos formados na fase oleosa dos caldos de cultura após crescimento das cepas bacterianas selecionadas.....	53
5.2.5 - Nível de compactação de bolhas formadas na fase oleosa dos caldos de cultura.....	57
5.2.6 - Valores de absorbância obtidos através de leitura espectrofotométrica dos caldos de cultura.....	60
6 - CONCLUSÃO.....	69
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8 - APÊNDICES.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Pesos e estruturas moleculares de cinco corantes (<i>amaranto</i> , <i>new coccine</i> , <i>orange G</i> , <i>tartrazina</i> e <i>eriglaucine</i>), artificiais e hidrossolúveis.....	16
Figura 2: Fórmulas estruturais de biosurfactantes produzidos por bactérias..	19
Figura 3: Perfil de compactação de bolhas nos halos formados na fase oleosa.....	30
Figura 4: Atividades de emulsificação (aumento de absorbância), frente ao tolueno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por dez dias, em meio contendo corantes.....	37
Figura 5: Atividades de emulsificação (aumento de absorbância), frente ao xileno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por dez dias, em meio contendo corantes.....	38
Figura 6: Atividades de emulsificação (altura dos halos), frente ao tolueno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por dez dias, em meio contendo corantes.....	39
Figura 7: Atividades de emulsificação (altura dos halos) frente ao xileno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por dez dias, em meio contendo corantes.....	40
Figura 8: Atividades de emulsificação (compactação de bolhas) frente ao tolueno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por dez dias, em meio contendo corantes.....	41
Figura 9: Atividades de emulsificação (compactação de bolhas) frente ao tolueno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por dez dias, em meio contendo corantes.....	42
Figura 10: Variação de massa seca para a linhagem A 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	45
Figura 11: Variação de massa seca para a linhagem C 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	45
Figura 12: Variação do pH para a linhagem A 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	47
Figura 13: Variação do pH para a linhagem C 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	47
Figura 14: Atividade de emulsificação (O/A) frente ao tolueno, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	51

Figura 15: Atividade de emulsificação (O/A) frente ao tolueno, durante o crescimento da linhagem C50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	51
Figura 16: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de absorbância, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	52
Figura 17: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de absorbância, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	52
Figura 18: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	55
Figura 19: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem C50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	56
Figura 20: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	56
Figura 21: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	57
Figura 22: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	58
Figura 23: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.....	59
Figura 24: Atividade de emulsificação em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes (artificiais e hidrossolúveis) e acréscimo de xileno.....	59
Figura 25: Atividade de emulsificação em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes (artificiais e hidrossolúveis) e acréscimo de xileno.....	60
Figura 26: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (524/590 nm) para o corante <i>amaranto</i> , artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.....	63

Figura 27: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (506/570 nm) para o corante <i>new coccine</i> , artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.....	63
Figura 28: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (476/510 nm) para o corante <i>orange G</i> , artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.....	64
Figura 29: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (430/480 nm) para o corante <i>tartrazina</i> , artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.....	64
Figura 30: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (620/680 nm) para o corante <i>erio Glaucine</i> , artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.....	65
Tabela 1: Testes bioquímicos para identificação da cepa C 50.....	66
Tabela 2: Leitura do Kit API 50 CHB – <i>Bacillus</i> , para linhagem C 50.....	67

RESUMO

No atual cenário mundial, o uso de corantes sintéticos tem se tornado um recurso cada vez mais utilizado pelas indústrias, com o intuito de tornar seus produtos comercialmente mais aceitáveis para o público. Por outro lado, uma grande parte desses corantes acaba sendo depositada no meio ambiente, principalmente através de efluentes despejados em rios ou cursos de águas, causando problemas de poluição cada vez maiores. Não se pode afirmar que exista um método ideal usado para tratar efluentes contendo corantes sintéticos, mas alguns métodos biológicos têm sido propostos com frequência, devido aos benefícios que apresentam em relação aos métodos tradicionais, como baixo custo.

Biosurfactantes são substâncias com caráter anfótero, que são produzidas por microrganismos cultivados em diversas fontes de carbono. Pouco ainda se conhece sobre os motivos que levam microrganismos a produzirem tais substâncias, mas um deles refere-se à necessidade de solubilização de substratos insolúveis.

O presente trabalho mostra a atividade de emulsificação apresentada por cepas bacterianas, os tipos de atividade de biosurfactantes produzidos pelas mesmas e avalia a capacidade de descoloração de corantes, artificiais e hidrossolúveis, pelas cepas bacterianas em estudo. Dentre as linhagens destacaram-se C 50 (identificada como *Bacillus subtilis*) e A 50 (não identificada), produzindo biosurfactante (nível de compactação de bolhas +4)

quando crescem em meio contendo corantes, artificiais e hidrossolúveis. Apresentaram também capacidade superior às demais cepas, na descoloração dos corantes contidos nos meios. Na segunda etapa do trabalho, a atividade de emulsificação frente ao tolueno, após dez dias de crescimento das linhagens A 50 e C 50 foram, respectivamente, 0,53 U em meio de cultura contendo *tartrazina* (oitavo dia) e 0,27 U em meio contendo *eriolglaucine* (quinto dia). Frente ao xileno, a atividade de emulsificação após dez dias de crescimento das linhagens A 50 e C 50 foram, respectivamente, 0,39 U, no quinto dia (meio contendo *orange G*) e 0,45 U no quarto dia (meio contendo *eriolglaucine*).

ABSTRACT

Worldwide at the present time synthetic dyes have been frequently employed by the industry to provide commercial products more acceptable to people. On the other hand, a great part of these dyes have been deposited in the environment, mainly through effluent discharges into water courses, resulting in growing pollution problems. There does not exist an ideal method that can be used to treat effluents containing synthetic dyes, but biological methods have been frequently proposed, probably due to their advantages in relation to the traditional methods, such as low costs.

Biosurfactants are substances with both hydrophylic and lipophylic character, produced by microorganisms growing on different carbon sources. There is not sufficient information about the reason why microorganisms synthesise biosurfactants, but one of them relates to the solubilization of insoluble substrates.

The present work shows bacterial emulsification activities and the different types of biosurfactant activities that these microorganisms can produce. The ability of some strains to remove the dyes color was evaluated. The C 50 (that was identified as *Bacillus subtilis*) and A 50 (not identified) cepas can produce biosurfactant (+4 compactation level) in artificial and hydrosoluble dye containing medium; it was observed that these cepas present superior ability to remove colour in the dye media: the emulsification activity in presence of toluen during the growth of the A 50 and C 50 cepas was 0,53

U (for *tartrazin*-containing medium) and 0,27 U (for *erioglaucine*-containing medium). In presence of xileno, the emulsification activity during the growth of the A 50 and C 50 strains was 0,39 U (for *orange G*-containing medium) and 0,45 U (for *erioglaucine*-containing medium).

1 - INTRODUÇÃO

Há dezenas de anos, muitos produtos químicos industriais, entre eles os corantes sintéticos, vêm sendo despejados em grande escala no meio ambiente. Uma vasta quantidade desses produtos, considerados contaminantes, pode ser rapidamente degradada por alguns microrganismos existentes no solo e na água. Contudo, a lentidão dos processos de degradação tem possibilitado um considerável acúmulo desses poluentes no meio ambiente. Esse acúmulo na biosfera pode causar um efeito chamado de “estresse ecológico” que, freqüentemente, é apontado como causa de contaminações prejudiciais à saúde humana (BELOTE, 2000).

Atualmente, tem havido um enorme interesse em solucionar o problema da cor nos cursos de águas, pois apesar de que muitas dessas colorações encontram-se naturalmente presentes, uma considerável proporção é originada dos efluentes, especialmente dos oriundos das grandes indústrias (KNAPP *et al.*, 1995).

A coloração nos efluentes tem causado crescentes preocupações, o que tem gerado esforços no sentido do desenvolvimento de processos mais efetivos para a remoção dessas cores (SANI *et al.*, 1998). Problemas ambientais, causados por resíduos tóxicos presentes na água, têm impulsionado cada vez mais pesquisas na área da remediação ambiental (TORREZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2001). Dentre os métodos de tratamento

atualmente propostos, os biológicos são alguns dos mais freqüentemente aceitos e utilizados (VAUTIER *et al.*, 2001).

Até o presente, pode-se dizer que mais de 10.000 corantes sintéticos estão disponíveis no mercado (KIRBY *et al.*, 1995). A indústria farmacêutica usa corantes individuais ou misturas de dois ou três corantes em seus produtos, com a finalidade de obter cores atrativas ao consumidor, para corrigir algumas colorações ou mesmo para a identificação de um produto (CAPITÁN-VALLVEY, 1998).

Já na indústria de alimentos, os corantes sintéticos são utilizados para tornar os produtos mais atraentes ao público, bem como para repor as cores naturais, perdidas durante o processamento do alimento (BOLEY *et al.*, 1980). Pode-se até mesmo afirmar que o uso dos corantes sintéticos orgânicos na indústria alimentícia tem sido, há muitos anos, reconhecido como o método mais viável e econômico para restauração dessas cores. A importância da coloração no alimento reside no fato de que a qualidade dos produtos, diferentemente dos aspectos microbiológicos, é baseada na cor, sendo esta um dos mais importantes atributos de qualidade sensorial. Ou seja, não importa o quão nutritivo ou saboroso possa ser o alimento, é improvável que seja consumido caso não apresente uma coloração desejada (SAYAR & ÖZDEMİR, 1998).

As indústrias têxteis consomem um substancial volume de água e produtos químicos no processamento dos tecidos. Há mais de 8.000 produtos químicos associados com o processo de coloração apresentados no Colour

Index como, por exemplo, os corantes azo (BANAT *et al.*, 1996). O maior problema enfrentado pelas indústrias encontra-se no tratamento de seus respectivos efluentes, caracterizados pela presença de grandes quantidades de corantes (inclusive corantes azo). A presença dessas substâncias é capaz de gerar intensa coloração nas águas residuais, dificultando ainda mais os processos de remoção (KUNZ *et al.*, 2001).

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Os corantes

O termo corante aditivo (corante artificial) pode ser aplicado a qualquer corante, pigmento ou outra substância fabricada ou obtida de um vegetal, mineral ou de outra fonte que seja capaz de colorir alimentos, drogas ou cosméticos (NEVADO *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, os aditivos alimentares têm sido muito investigados, a fim de avaliar a sua toxicidade. Uma investigação toxicológica para os corantes que são usados em alimentos tem sido feita em vários países do mundo (BERZAS *et al.*, 1999), não apenas para os que estão atualmente em uso, mas para aqueles cujo uso está sendo proposto (CODEX ALIMENTARIUS, 1992).

Apesar disso, a evidência toxicológica para corantes sintéticos é consideravelmente maior do que para corantes naturais, pois a complexidade química e a dificuldade de definir especificações fazem com que a avaliação toxicológica dos corantes naturais seja impossível (NEVADO *et al.*, 1999).

Os aditivos alimentares aprovados para uso são aqueles cuja avaliação indica não apresentarem perigo para a saúde do consumidor, em conformidade com os níveis de uso propostos para cada um, devendo permanecer sob

contínua observação. Reavaliações também se fazem necessárias, sempre que as condições de uso de um aditivo alimentar forem modificadas ou que seja identificada uma nova informação científica acerca do aditivo (CODEX ALIMENTARIUS, 1992).

O uso dos aditivos alimentares somente é justificado em casos específicos (como aumentar a qualidade nutricional do alimento ou, no caso dos corantes, repor cores perdidas durante a manufatura), mas nunca para disfarçar ou esconder práticas indesejáveis de manufatura ou armazenamento, (como falta de higiene no preparo dos alimentos). A aprovação ou inclusão temporária de um aditivo no alimento deve levar em conta algumas considerações: estar limitada a alimentos, propósitos e condições de emprego específicos; utilizar sempre o mais baixo nível para atingir o efeito desejado; levar em conta o consumo diário estabelecido para cada aditivo (CODEX ALIMENTARIUS, 1992).

2.1.1 - Características dos corantes azo

Os corantes azo representam a mais larga classe de corantes existente, com as maiores variedades de cores e estruturas (CRIPPS *et al.*, 1990), sendo também os mais numerosos dentre os corantes sintéticos manufaturados (PASTI-GRISBY *et al.*, 1992). São classificados como corantes sintéticos orgânicos e apresentam grande diversidade estrutural, onde a característica principal é a presença de uma dupla ligação capaz de unir dois átomos de

nitrogênio (ZISSI & LYBERATOS, 1996). Esses grupamentos azo ($-N=N-$), como são chamados, podem aparecer na molécula do corante uma ou mais vezes, em associação com um ou mais sistemas aromáticos (WONG & YUEN, 1998). São empregados para colorir e estampar fibras têxteis naturais e sintéticas, couro, forrações, papel (BELOTE, 2000), alimentos e produtos farmacêuticos (RAZO-FLORES *et al.*, 1997).

Assim como muitos outros corantes sintéticos, os corantes azo apresentam resistência à degradação microbiana, sob condições normais existentes nas plantas de tratamento de efluentes (KIRBY *et al.*, 1995), onde freqüentemente podem ser encontrados intactos, sem aparentes modificações químicas moleculares (KECK *et al.*, 1997). Por não serem prontamente degradados em sistemas de tratamento biológicos, os corantes azo são considerados um problema ambiental significativo, mesmo nos locais onde são fabricados e usados. Contaminam, com seus efluentes e lodos residuais, os rios e terrenos onde os lodos são dispostos causando, por exemplo, inibição da fotossíntese superficial nos rios e coloração nos lençóis freáticos (BELOTE, 2000).

A presença dos corantes azo no meio ambiente tem contribuído com o aumento da poluição no planeta (CAO *et al.*, 1993). Muitos desses compostos apresentam características mutagênicas, carcinogênicas ou mesmo bioacumulação na cadeia alimentar (RAZO-FLORES *et al.*, 1997). Peixes podem acumular poluentes de forma direta, através de produtos químicos presentes na água, ou indiretamente, alimentando-se de organismos vivos presentes em águas contaminadas (AL-SABTI, 2000).

Vários microrganismos capazes de degradar compostos azo têm sido isolados, entre eles *Bacillus subtilis* e *Clostridium spp* (PASTI-GRISBY *et al.*, 1992).

Entre as linhagens produtoras de biosurfactante, *Planococcus citreus* se destaca pela produção de biosurfactante do tipo óleo em água. Estudos realizados mostram que quando emulsões diferentes (tipos água em óleo ou óleo em água) são formadas durante o crescimento de diferentes bactérias, provavelmente os biosurfactantes produzidos possuam estrutura molecular e propriedades distintas (JACOBUCCI, 2000).

2.1.1.1 - Tartrazina

A *tartrazina* pertence a um grupo azo de corantes sintéticos para alimentos (SAYAR & ÖZDEMİR, 1998), classe monoazo, com fórmula molecular $C_{16}H_{19}N_4O_9S_2Na_3$, C.I. 19 140 e peso molecular 534,4. É conhecida também como Jaune Tartrique, Food Yellow 4 ou Acid Yellow 23. Quando em contato com a água, a *tartrazina* forma uma solução amarela. Pode ser usada para produzir várias cores, como nuances amarelo-ovo, verdes e tons de marrom (FARBSTOFF-KOMMISSION, 1988), tendo utilização em produtos variados, como os de padaria, bebidas, balas, laticínios (SAYAR & ÖZDEMİR, 1998), iogurtes, sorvetes (NEVADO *et al.*, 1998), limonadas e farmacêuticos. No mercado, a tartrazina pode ser encontrada sob forma de pó ou mesmo granulado. É comumente adicionada ao alimento para recolocação

da cor natural, que pode ser perdida durante o processamento (BERZAS *et al.*, 1999), mas seu teor deve ser devidamente controlado, pois o seu contato com alguns tipos de drogas (como aspirina, ácido benzóico e outros analgésicos) no corpo humano, podem induzir alergias e reações asmáticas nas pessoas que apresentem sensibilidade (NEVADO *et al.*, 1998). Nos produtos em que é usada, a dose máxima permitida por lei é de 70 mg/L (CAPITÁN-VALLEY *et al.*, 1998). Concentração do corante para usos diversos: 5-50 g/100 Kg. Quando exposta ao calor, a *tartrazina* apresenta resistência térmica até 150°C. É resistente a álcalis e mais ainda aos ácidos. Apresenta a propriedade de ser estável à luz. No que se refere à solubilidade, a *tartrazina* apresenta as seguintes propriedades: tanto em água quente 90°C como em água fria 25°C, apresenta solubilidade maior que 120 g/L; em etanol, esta cai para menos que 1 g/L; já em óleos vegetais, a *tartrazina* é insolúvel (FARBSTOFF-KOMMISSION, 1988).

2.1.1.2 - *New coccine*

New coccine é um corante sintético do grupo azo, classe monoazo, que apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$, C.I. 16255 e peso molecular 604,5. Pode também ser reconhecido como Food Red 7, Acid Red 18, Brilliantponceau 4 R C, Viktoriascharlach 4 R, Ponceau 4 R ou Neucoccin. É resistente a álcalis (mudança de coloração para o marrom), ácidos e apresenta resistência térmica até 150°C. É estável à luz. A solubilidade em água quente

90°C é maior que 120 g/L, bem como em água fria 25°C. É parcialmente solúvel em contato com o etanol e insolúvel em óleos vegetais. Concentração do corante para diversos usos: 5-50 g/100Kg; 1Kg é suficiente para a coloração de 2000 Kg em volume ou mais de 20.000 L de bebida. O *new coccine* é um corante vermelho, mas pode também ser usado para obter-se outros tons, como marrom. Com isto, é utilizado para colorir produtos como bebidas, salmão marinho e geléias. No mercado, pode ser encontrado como pó ou granulado (FARBSTOFF-KOMMISSION, 1988).

2.1.1.3 - *Amaranto*

O *amaranto* pertence ao grupo dos corantes azo, classe monoazo, sendo também conhecido como Acid Red 27, Food Red 9, Amarante, Naphtholrot S, Amaranth, entre outros. Apresenta fórmula molecular $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$, peso molecular 604,5 e C.I. 16 185. Em contato com altas temperaturas, apresenta resistência térmica até 150°C. É resistente a álcalis (mudança para cor azul), assim como a ácidos (mudança para a cor azul). Apresenta estabilidade tolerável à luz. Em água quente (90°C), apresenta solubilidade maior que 70 g/L; já em água fria (25°C), a solubilidade do *amaranto* é de 70 g/L. Em contato com o etanol, apresenta-se de forma parcialmente solúvel; entretanto, torna-se insolúvel em contato com óleos vegetais. Em contato com a água, forma uma solução vermelha, mas pode também ser usado na preparação de cores marrons, sendo utilizado para conferir cor a produtos como bebidas,

frutas em conserva, confeitos e sorvetes (FARBSTOFF-KOMMISSION, 1988). O *amaranto* é um dos corantes azo mais largamente utilizados pelas indústrias de corantes (YOSHIDA *et al.*, 1999).

No mercado, pode ser encontrado na forma de pó ou granulado. Concentração do corante para usos diversos: 5 a 40 g/100Kg; 1 Kg permite a coloração de aproximadamente 2.500 Kg ou mais de 20.000 L de bebida (FARBSTOFF-KOMMISSION, 1988).

2.1.1.4 - *Orange G*

Orange G é um corante sintético, pertencente ao grupo dos corantes azo, sendo também chamado de Acid Orange 10, ácido 7-hidroxi-8-fenilazo-1,3-naftalenodissulfônico, entre outros. Apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$, C.I. 16230 e peso molecular 452,36 (CATÁLOGO ICN, 1998). A solubilidade apresentada pelo *orange G* em água 20°C é de 5%; já em contato com etanol e dietil éter, é insolúvel (CATÁLOGO MERCK, 1996).

2.1.2 - Características dos triarilmetanos

Os triarilmetanos são corantes largamente usados nas indústrias têxteis para colorir nylon, lã, seda e algodão. As indústrias de papel e de couro também utilizam esses corantes, para colorir plásticos, gasolina, verniz, graxas, óleos e ceras. Outras indústrias que também utilizam os trifenilmetanos são as de produtos alimentícios, cosméticos e produtos farmacêuticos, como agentes dermatológicos (AZMI *et al.*, 1998).

2.1.2.1 - *Erioglaucine*

Erioglaucine é um corante artificial, classificado como um triarilmetano, devido à sua estrutura molecular. Pode ser reconhecido como Brilliant Blue FCF, FD&C Blue No. 1 (sendo que este é o nome oficial que o corante recebe do Food and Drug Administration) e CI Food Blue 2 (42090). Apresenta a fórmula empírica $C_{37}H_{34}N_2O_9S_3$ e seu peso molecular é de 792.84. Quando em contato com a água, o *eriglaucine* forma uma coloração azul. Seu uso é permitido em produtos como alimentos, drogas e cosméticos (MARMION, 1991).

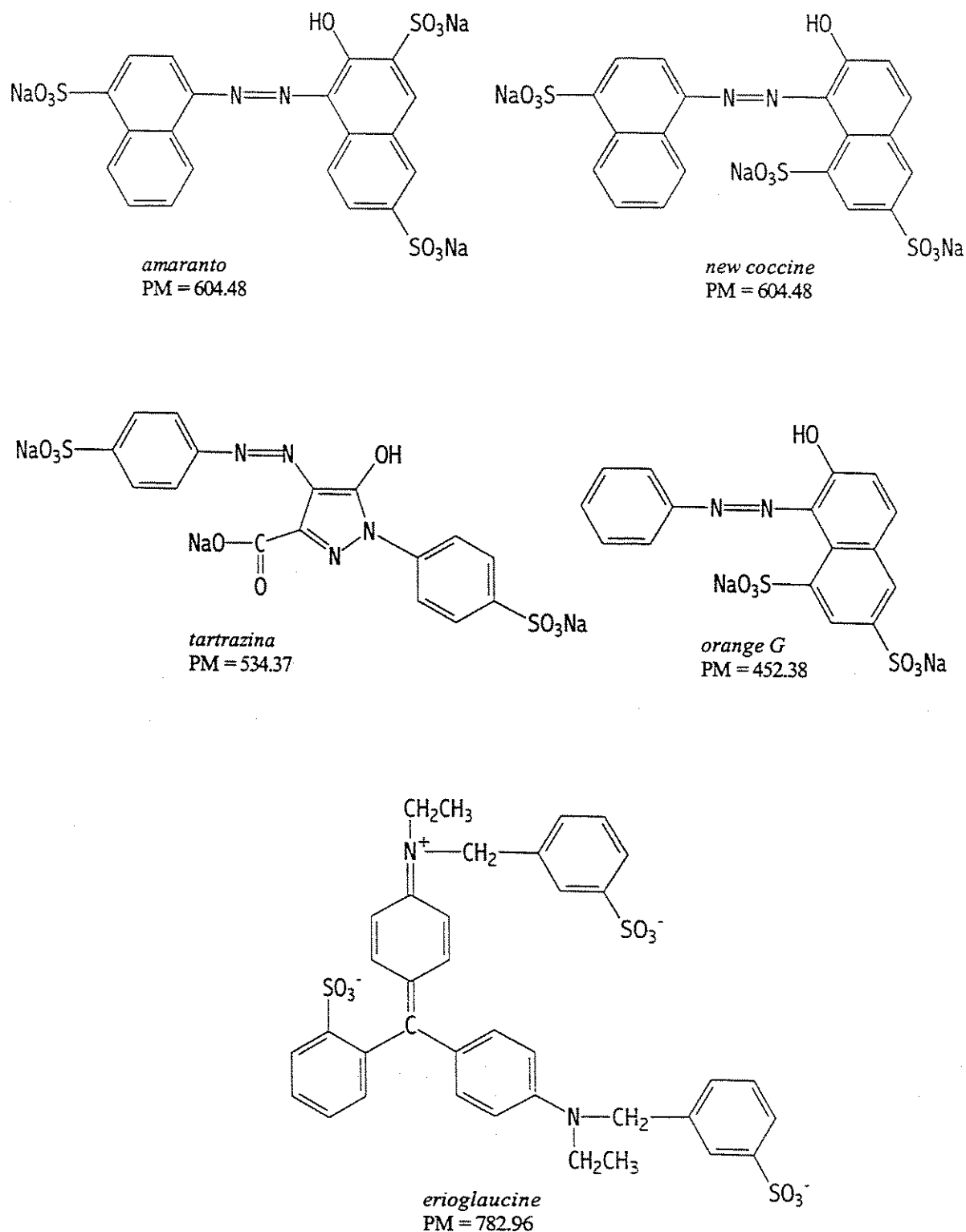


Figura 1: Pesos e estruturas moleculares de cinco corantes (*amaranto*, *new cocchine*, *orange G*, *tartrazina* e *eriglaucine*), artificiais e hidrossolúveis (Aldrich, 2000-2001).

2.2 - Biosurfactantes

2.2.1 - Características estruturais e obtenção de biosurfactantes

Os surfactantes biológicos, ou biosurfactantes, são biomoléculas que apresentam duas partes principais em sua estrutura, sendo uma parte lipofílica e outra parte hidrofílica. A parte lipofílica ou apolar é formada pela cadeia hidrocarbônica de um ácido graxo ou anel esterol. Já a parte hidrofílica ou polar é formada pelo grupo carboxil dos ácidos graxos ou aminoácidos, o grupo fosforil dos fosfolipídeos, grupo hidroxil dos sacarídeos, e também os peptídeos. A maioria dos biosurfactantes é produzido por bactérias, leveduras e fungos, durante o cultivo em várias fontes de carbono. Entretanto, a razão pela qual esses microrganismos produzem os surfactantes ainda não é conhecida. Nas jazidas de óleos, algumas bactérias são capazes de degradar óleos e produzir biosurfactantes extracelulares. Nesse caso, os biosurfactantes facilitam a degradação microbiana através da emulsificação do substrato. Contudo, alguns microrganismos que não apresentam a capacidade de degradar óleos também produzem biosurfactantes. Outra explicação possível é a de que os biosurfactantes são produzidos como substâncias antimicrobianas, para defender as células de possíveis ataques efetuados por outros microrganismos (MORIKAWA *et al.*, 2000).

Os biosurfactantes são compostos naturais, biodegradáveis e podem ser menos tóxicos que os surfactantes sintéticos. Devido a sua estrutura

diferenciada, os biosurfactantes apresentam várias propriedades que podem ser exploradas comercialmente, como a redução das tensões superficial e interfacial do meio aquoso, a remediação de compostos orgânicos e metálicos, podendo também ser usados como aditivos em cosméticos e no controle biológico. Esta extensa gama de aplicações dos biosurfactantes tem aumentado o interesse na sua produção, mas muito pouco ainda se sabe a respeito da distribuição dos microrganismos produtores dessas substâncias no meio ambiente (BODOUR *et al.*, 1998). A surfactina é um dos muitos tipos de biosurfactantes existentes e pode ser produzido por *Bacillus subtilis*. Apresenta grande importância industrial, o que tem aumentando grandemente o interesse biotecnológico em sua produção, além de atrair cada vez mais a atenção da indústria farmacêutica (KOWALL *et al.*, 1998).

A determinação de atividades de emulsificação serve para avaliar o potencial do agente de superfície ativa produzido pelas linhagens bacterianas, como em trabalhos que utilizam *Pantoea agglomerans* e *Planococcus citreus* (JACOBUCCI, 2000).

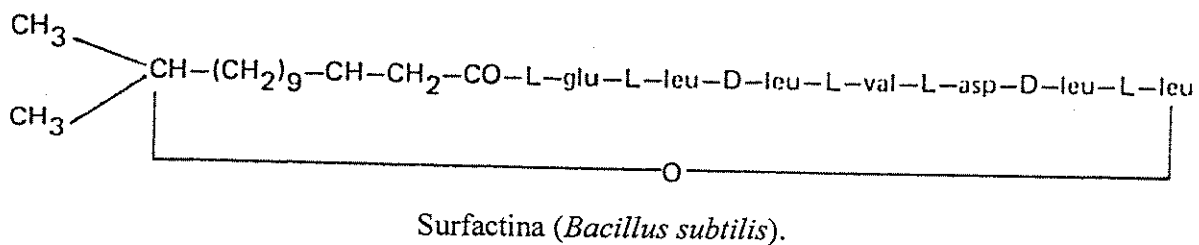
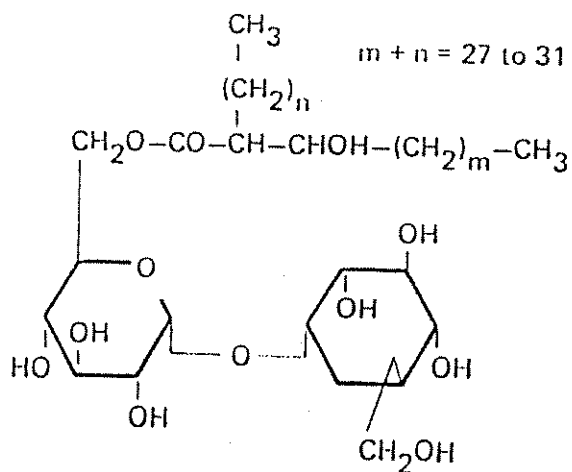
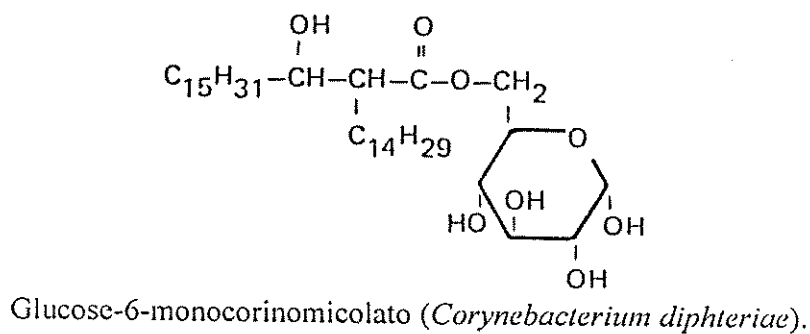
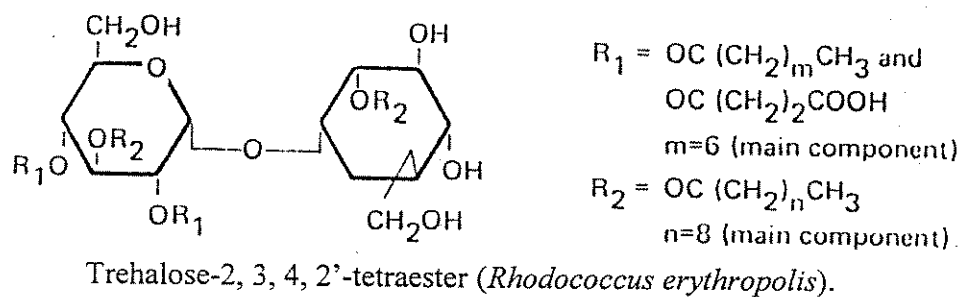


Figura 2: Fórmulas estruturais de biosurfactantes produzidos por bactérias.

Fonte: Aldrich Handbook (2000 – 2001).

2.2.2 – Propriedades dos surfactantes

Para efeitos práticos, é necessário antes de tudo que um surfactante apresente uma boa propriedade de detergência. Para que um detergente seja considerado satisfatório, ele deve apresentar algumas propriedades, tais como boa qualidade de umedecimento, de modo que possa haver um contato íntimo entre o mesmo e a superfície a ser limpa; capacidade para remover ou ajudar na remoção da sujeira para dentro do líquido, afastando-a da superfície; e, finalmente, capacidade de solubilizar ou dispersar a sujeira removida, impedindo que ela se deposite novamente sobre a superfície limpa. Quando se fala em remoção das impurezas pelo uso dos surfactantes, geralmente se pensa nelas como tendo uma natureza oleosa. Ainda, a remoção da partícula indesejável geralmente é realizada através de agitação mecânica simples. Em face disto, vale lembrar que há uma enorme tendência psicológica do público consumidor em correlacionar a formação de espuma no processo de limpeza com a atividade do detergente. Ou seja, a melhor aceitação de mercado tenderá para surfactantes que apresentem, além de excelente atividade detergente, a propriedade de formação de espumas (SHAW, 1975).

2.3 - Biodegradação e demais métodos de tratamento de águas

Águas residuais contendo corantes apresentam uma aparência tão diferenciada, que há uma enorme tendência para repudiá-las e a obtenção de

uma descoloração eficiente torna-se então indispensável para o seu adequado tratamento (YOSHIDA *et al.*, 1999).

A alteração da cor é o primeiro indicativo de contaminante a ser reconhecido nas águas residuais, devendo ser removido antes que estas sejam descarregadas nos corpos de águas naturais ou mesmo no solo. Mesmo quantidades muito pequenas de corantes em águas residuais tornam-se altamente visíveis e vêm a afetar o aspecto e a transparência das águas em lagos, rios e outros corpos (BANAT *et al.*, 1996).

Há uma diferença entre os termos descoloração e biodegradação. A descoloração pode ser definida como a remoção da cor, obtida apenas através da troca do grupo cromóforo por outro, que seja não cromóforo. Já a biodegradação é definida como a quebra da molécula do substrato (no caso, o corante) através de um processo biológico. Em muitos países, há leis ambientais que regulamentam e fazem obrigatória a descoloração de águas residuais que contenham corantes, antes mesmo que estas sejam descarregadas nos cursos de águas naturais (AZMI *et al.*, 1998). As legislações governamentais estão se tornando cada vez mais estritas em muitos dos países desenvolvidos, em relação a remoção de corantes dos efluentes industriais, que vem se tornando um problema crescente para as indústrias têxteis. Isto significa que, para muitas indústrias têxteis, desenvolver facilidades para o tratamento de seus próprios efluentes antes da descarga tem sido mais favorável (BANAT *et al.*, 1996).

Vários métodos de descoloração têm sido propostos como, por exemplo, o método de absorção usando carbono ativado e o método de oxidação. Este último pode ser classificado também como oxidação por ar, oxidação por ozônio, oxidação por hipoclorito, eletroxidação direta, entre outros. As oxidações por ozônio e por hipoclorito são consideradas métodos de descoloração mais econômicos, mas não são muito atraentes por causa do alto investimento que suas plantas e equipamentos exigem (YOSHIDA *et al.*, 1999). Similarmente, vários processos de tratamento de efluentes, como floculação, precipitação, adsorção, ozônio, extração por par iônico, métodos eletroquímicos e cloração são comumente usados para tratar a água contendo resíduo de corantes (SANI *et al.*, 1998). Todos estes métodos apresentam diferentes resultados para remoção das cores, capacidade de volume e velocidade de operação. Há alguns exemplos que demonstram essas diferenças, como carvão ativado, que é extremamente eficiente na remoção das cores, mas apresenta capacidade de tratar apenas um pequeno volume de efluente e opera em baixa velocidade; o tratamento por ozônio, por sua vez, opera em velocidade moderada. O método de lodo ativado também tem sido usado por muitas indústrias produtoras de corantes para o tratamento de águas residuais, apesar de alguns corantes serem tóxicos para os microrganismos, reduzindo sua capacidade de ação (AZMI *et al.*, 1998). Devido à grande utilização de corantes sintéticos pelas indústrias, muitos métodos de degradação biológica vêm sendo propostos ao longo dos anos (MARTINS *et al.*, 2001). Publicação sobre biodegradação de corantes triarilmetanos foi realizada por YATOME *et al.*(1991), relatando a descoloração do corante cristal violeta por *Bacillus subtilis*. A descoloração de triarilmetanos por *Rhodococcus sp.* e *Mycobacterium sp.* foi relatada por ROTH *et al.*(1992).

Trabalhos sobre biodegradação de corantes azo através de consórcio de bactérias foram publicados por CHUNG & STEVENS (1993) e HAUG *et al.* (1991).

Nem todos os corantes são tóxicos, mas mesmo estes são considerados como um problema de poluição, devido a cor que apresentam (CRIPPS *et al.*, 1990). Não existem métodos universais usados para tratamento de resíduos de corantes, provavelmente por causa da complexidade e variedade de estruturas químicas desses compostos (KNAPP *et al.*, 1995). Há, portanto, necessidade de se desenvolver um método biológico prático para tratamento de resíduos, que possa ser usado para uma ampla faixa de corantes (KNAPP *et al.*, 1995). Por este motivo, a biodegradação vem ganhando popularidade na remoção de resíduos perigosos, devido aos baixos custos e benefícios apresentados pela degradação microbiana (SANI *et al.*, 1998).

3 - OBJETIVOS

O presente trabalho pretende avaliar a capacidade apresentada por oito cepas bacterianas (*Bacillus cereus*, *Planococcus citreus*, A 50, C 50, B3G, 7 I, A 30 e AO 30), na descoloração de cinco corantes (amaranto, new coccine, orange G, tartrazina e erioglaucine), artificiais e hidrossolúveis, bem como os tipos de atividade de biosurfactantes, produzidos pelas cepas.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Introdução

No presente trabalho será realizada uma seleção, em termos de produção de biosurfactante, entre oito cepas bacterianas (*Planococcus citreus*, *Bacillus cereus*, A 50, C 50, 7 I, B3G, A 30 e AO 30), cultivadas em meio de cultura líquido, com adição de cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis (*amaranto*, *new coccine*, *orange G*, *tartrazina* e *eriglaucine*), com retirada de amostras após dez dias de incubação a 55°C. Escolhidas as melhores produtoras, estas serão submetidas a uma segunda fase de análises, que incluem nova inoculação, variações de pH e do peso seco em relação ao tempo de crescimento de cada cepa (as análises serão realizadas a cada 24 horas de incubação a 55°C).

4.2 - Corantes artificiais

Cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis, foram utilizados para determinação da capacidade de descoloração e produção de biosurfactantes por cepas bacterianas, sendo estes os corantes azo *amaranto*, *new coccine*, *orange G* e *tartrazina*, e o triarilmetano *eriglaucine*.

4.3 - Microrganismos

Oito cepas microbianas, *Bacillus cereus*, *Planococcus citreus*, A 50, C 50, B3G, 7 I, A 30 e AO 30, pertencentes a Coleção de Culturas do Laboratório de Fisiologia e Sistemática Microbiana, foram utilizadas neste trabalho.

A linhagem A 50 foi isolada de efluente de indústria de corantes (55°C), sendo bastonete curto (Gram +), esporulado. A linhagem C 50, isolada de efluente de indústria de corantes (55°C), apresenta-se como bastonete curto e fino (Gram +), esporulado. A linhagem B3G, identificada como *Bacillus* sp (KUSHIDA, 2000), foi isolada de borra oleosa do solo, sendo cultura de cor creme, com borda rugosa, formada por bastonetes pequenos esporulados (Gram +), com esporo terminal. A linhagem 7I apresenta-se na forma de bastonetes (Gram -), com filamentos finos e longos. A linhagem A 30 foi isolada de efluente de indústria de corantes, apresentando-se na forma de bastonete curto (Gram +). A linhagem AO 30 foi isolada de efluente de indústria de corantes e apresenta-se na forma de bastonete curto (Gram -).

4.4 – Manutenção das cepas bacterianas

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

As linhagens bacterianas *Bacillus cereus*, A 50, C 50, B3G, 7 I, A 30 e AO 30 foram mantidas em Agar Nutriente (AN) e a linhagem *Planococcus citreus* em agar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona). O crescimento das cepas ocorreu a 30°C (exceto A 50 e C 50, que foram incubadas a 55°C) durante 48 horas e a armazenagem em geladeira a 4°C ou por congelamento a -20°C, em tubos para criogenia de 1,8 mL (NUNC), em solução auqosa de glicerol 10% (v/v).

4.5 – Condições de cultivo dos microrganismos

Utilizou-se meio de cultura líquido para o estudo da descoloração de corantes artificiais e produção de biosurfactantes, constituído por 0,5g de MgSO₄; 3,0g de NaNO₃; 1,0g de KH₂PO₄; 1,0g de extrato de levedura; e 0,3g de peptona bacteriológica, dissolvidos a cada 1000 mL de água destilada, com acréscimo de 50 mg de corante por litro de solução. O pH foi ajustado em 6,5 e o meio esterilizado em autoclave, por quinze minutos, a 121°C.

Foram utilizadas cinco alçadas de 10µL de inóculo das cepas para cada 75 mL do meio de cultura líquido, em triplicata. O crescimento foi realizado em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL e incubados a 55°C, em repouso ou sob agitação constante a aproximadamente 150 rpm, por um período máximo de dez dias.

4.6 - Corantes artificiais como fontes de carbono

Cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis, foram utilizados como fontes de carbono para crescimento das linhagens bacterianas e posterior determinação da capacidade de descoloração e produção de biosurfactantes por estas cepas, sendo estes os azo corantes *amaranto*, *new coccine*, *orange G* e *tartrazina*, e o triarilmetano *eriglaucine*. A concentração utilizada de corante no meio de cultura foi de 50 mg/L.

4.7 – Seleção de microrganismos produtores de alta atividade de emulsificação

Numa primeira etapa, as linhagens bacterianas foram cultivadas como descrito no item anterior, sem agitação, e testadas com a finalidade de se detectar as melhores produtoras de atividades de emulsificação.

Após dez dias de cultivo, as células bacterianas foram separadas dos caldos de cultura por centrifugação, e estes conservados sob congelamento, para as análises de atividade de emulsificação.

4.7.1 - Atividade de biosurfactante

A atividade de biosurfactante foi determinada conforme o tipo de emulsão formada (água em óleo ou óleo em água), utilizando-se os caldos de cultura anteriormente congelados.

As atividades de emulsificação foram determinadas adicionando-se 3,5 mL de caldo de cultura em tubos de ensaio (Pyrex de 13x100 mm e 1cm de diâmetro), utilizando-se 2,0 mL de tolueno ou xileno, como substratos-teste. Para a determinação das emulsões do tipo óleo em água (O/A), efetuou-se leitura da absorbância a 610 nm em espectrofotômetro (Spectronic 20 – Bausch & Lomb), sem prévia agitação. A seguir, procedeu-se vigorosa agitação, em agitador automático (Vortex), por um minuto. Decorrido o tempo de uma hora, foi realizada uma nova leitura, a 610 nm, para determinação da densidade óptica da solução. O cálculo para atividade de emulsificação do tipo óleo em água pôde ser obtido pela diferença entre o valor obtido antes da agitação dos tubos, em relação ao obtido após agitação. A variação de densidade óptica encontrada é definida como atividade de emulsificação e é expressa em unidades de emulsificação (U). Uma unidade de emulsificação corresponde à quantidade de biosurfactante capaz de elevar a absorbância do sistema em uma unidade. Após vinte e quatro horas, a altura do halo formado na fase oleosa pelas emulsões do tipo água em óleo (A/O) foi expressa em centímetros (COOPER e GOLDENBERG, 1987). Os halos foram classificados de acordo com o tamanho e compactação das bolhas, em +1 a +4 (figura 2), sendo que o código +4 foi utilizado como referência do grau máximo de compactação de bolhas (JACOBUCCI, 2000).

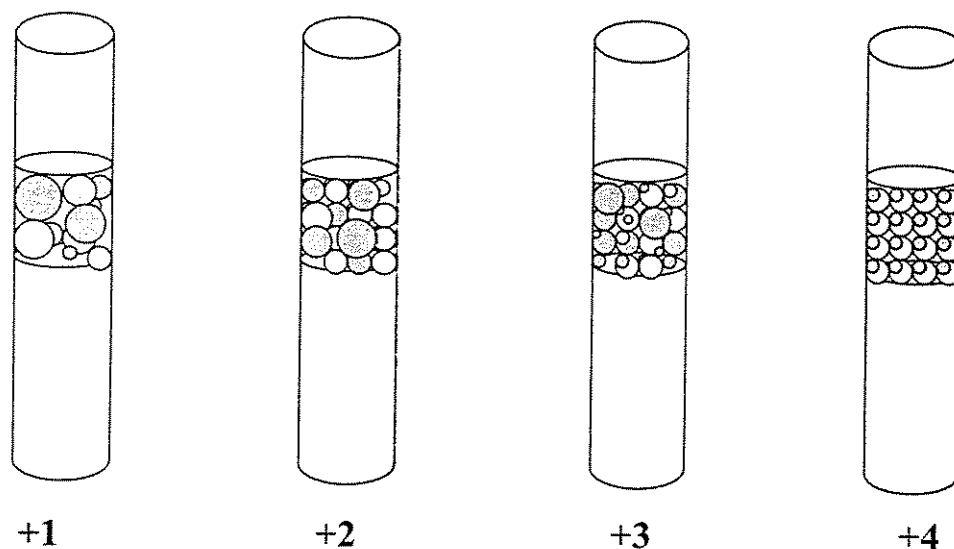


Figura 3: Perfil de compactação de bolhas nos halos formados na fase oleosa (JACOBUCCI, 2000).

4.8 – Estudos realizados com as cepas bacterianas selecionadas

As linhagens selecionadas por apresentarem maiores atividades de emulsificação (A 50 e C 50), foram cultivadas a 55°C, por um período de dez dias, com amostras retiradas a cada 24 horas. Foram utilizados frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL, contendo 75 mL do meio de cultura líquido, em pH final 6,5 e agitação de aproximadamente 150 rpm. Através de centrifugação, as células bacterianas foram separadas dos caldos de cultura. A atividade de biosurfactante foi determinada como descrito no item anterior, e a

determinação da massa bacteriana seca, do pH e descoloração foram realizadas conforme descrito a seguir.

4.8.1 - Determinação da massa bacteriana seca e da variação do pH do meio de cultivo das cepas bacterianas selecionadas

A massa seca resultante da centrifugação (aproximadamente 16.000 g, durante 15 minutos, a 25°C) dos caldos de cultura, foi lavada com água destilada até remoção do excesso de corante, depois seca (utilizando-se placa de Petri previamente pesada) em estufa até obtenção de peso constante (KUSHIDA, 2000).

O pH do filtrado foi verificado, para comparação com o pH 6,5 inicial.

4.8.2 - Determinação da descoloração dos corantes artificiais pelas cepas bacterianas selecionadas

A partir do descongelamento dos caldos de cultura, foi efetuada a análise para verificação da descoloração dos corantes artificiais, pela ação das bactérias. Para tanto, foram utilizados três tipos diferentes de amostras como controle, conforme descrito a seguir:

- 1) Meio de cultura líquido, contendo corante e sem inóculo, a um tempo zero de incubação;
- 2) Corante preparado a fresco, em meio de cultura líquido;
- 3) Solução de corante artificial diluído em água destilada, sem esterilização.

Através de varredura em espectrofotômetro, percorrendo-se a região do UV - Visível (entre 200 e 800 nm), foram obtidos os picos máximos e mínimos de absorbância para cada corante. A descoloração foi observada conforme a diminuição da absorbância em cada amostra, nos comprimentos de onda de máxima (Abs max) e mínima (Abs mín) absorbância.

Esta leitura foi efetuada em dois comprimentos de onda, conforme descrito por GLENN & GOLD (1983). A adsorção e a transformação do corante pela ação de microrganismos são responsáveis pela diminuição da intensidade de cor na solução. Assim sendo, se a razão entre Abs max/Abs min permanece constante ou modifica-se muito pouco, isto indica que houve adsorção do corante ao micélio, mas se há modificação na razão entre abs max/abs min, significa que o corante está sendo degradado pela ação microbiológica (GLENN & GOLD, 1983).

4.9 - Identificação das cepas bacterianas selecionadas

Na identificação das cepas bacterianas de interesse, foram utilizados os seguintes testes bioquímicos:

- teste de KOH, onde uma gota de hidróxido de potássio foi aplicada numa lâmina de vidro, sobre um inoculo denso de cultura, para posterior observação da lise celular (BUCHANAN *et al.*, 1974). Este teste é auxiliar na interpretação da coloração de Gram. O hidróxido de potássio (KOH) lisa a parede celular das bactérias Gram -, liberando o material genético, que se torna viscoso na presença de KOH. As bactérias Gram + resistem ao tratamento devido à estrutura da parede celular (MAC FADDIN, 1980);

- teste de catalase, onde foram adicionadas três gotas de água oxigenada 3% num tubo de ensaio, contendo inoculo de cultura de 24 horas em 1 mL de água destilada, observando-se logo a seguir a ocorrência ou não de liberação de gás oxigênio (BUCHANAN *et al.*, 1974). Neste teste, a detecção da produção da enzima catalase pela bactéria ocorre através de observação do desprendimento de bolhas (O₂), quando água oxigenada é adicionada à cultura (MAC FADDIN, 1980);

- teste de oxidase, onde a cultura foi espalhada com uma alça de inoculação sobre um disco de papel de filtro, acrescentando-se uma gota de reagente de oxidase sobre a cultura, visando o surgimento de coloração azul escura (positivo) ou não (negativo) (BUCHANAN *et al.*, 1974). Este teste é utilizado para verificação da presença da enzima citocromo c (oxidase) que, na presença de oxigênio atmosférico, oxida o reagente de oxidase (dimetil - *p* - fenilenodiamina) de coloração azul forte (MAC FADDIN, 1980);

- teste de coloração de esporos, com acréscimo de verde malaquita e safranina sobre um esfregão da cultura em lâmina de vidro, para posterior observação ao microscópio óptico (BUCHANAN *et al.*, 1974);

- teste TSI (triple sugar iron agar), no qual a cultura foi inoculada por picada no fundo de um tubo contendo TSI, depois espalhada sobre a base inclinada do meio e inoculada à temperatura de crescimento da cepa (BUCHANAN *et al.*, 1974). Este teste visa determinar a habilidade de um organismo para utilizar um carboidrato específico, incorporado em um meio basal de crescimento, com ou sem produção de gás, juntamente com a possível produção de H₂S (MAC FADDIN, 1980);

- teste agar citrato, onde a cultura foi inoculada num tubo de ensaio contendo meio citrato e inoculada à temperatura de crescimento (BUCHANAN *et al.*, 1974). É também chamado de teste de citrato de Simmons, onde a utilização do citrato como única fonte de carbono resulta na alcalinização do meio (MAC FADDIN, 1980);

- kit API 50 CHB – *Bacillus*, onde aplicou-se uma solução do inóculo sobre uma cartela de API 50 CH (bioMérieux), com posterior incubação à temperatura de crescimento da cepa, efetuando-se leitura (bioMérieux – Mini API) após 24 horas de incubação (MAC FADDIN, 1980).

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As figuras de 4 a 9 referem-se à etapa de seleção, entre as oito cepas bacterianas em estudo, das que produzem alta atividade de emulsificação, onde foram confrontados os seguintes resultados: determinação da atividade de emulsificação (figuras 4 e 5); altura dos halos formados pela presença de biosurfactante do tipo A/O, expressa em centímetros (figuras 6 e 7); e classificação dos halos formados pela compactação das bolhas, variando entre +1 e +4 (figuras 8 e 9). Nesta primeira etapa, as linhagens A 50 e C 50 mostraram-se melhores produtoras de atividade de biosurfactante que as demais cepas analisadas. As figuras 10 a 30 referem-se aos estudos realizados com as cepas bacterianas A 50 e C 50, sendo estes: variação do peso seco (figuras 10 e 11); variação do pH (figuras 12 e 13); atividades de emulsificação tipo O/A frente ao tolueno ou xileno (figuras 14 a 17); variação de altura de halos, formados frente ao tolueno ou xileno (figuras 18 a 21); compactação de bolhas, obtida sob vigorosa agitação em Vortex (figuras 22 a 25); e leitura dos picos de absorção para os corantes artificiais *amaranto* (figura 26); *new coccine* (figura 27); *orange G* (figura 28); *tartrazina* (figura 29); e *erioglaucine* (figura 30).

5.1 – Seleção de microrganismos

A seleção das cepas bacterianas produtoras de alta atividade de emulsificação foi realizada após análise dos tipos de emulsão formadas: O/A (através de espectrofotometria a 610 nm) ou A/O (altura dos halos e compactação das bolhas formados na fase oleosa). As cepas bacterianas selecionadas foram A 50 e C 50.

5.1.1 – Determinação das emulsões tipo óleo em água

Os resultados da formação de emulsões do tipo O/A para oito cepas bacterianas cultivadas a 55 °C em meio contendo corantes sintéticos, frente ao tolueno (fig. 4) ou xileno (fig. 5), foram confrontados. As cepas A 50 e C 50 mostraram-se melhores produtoras de atividade de emulsificação que as demais linhagens em estudo. KUSHIDA (2000) observou que, a 30°C, a cepa *Bacillus cereus* mostra-se excelente produtora de emulsificação do tipo O/A.

Analisando-se a figura 4, observa-se que a cepa A 50 apresentou os maiores aumentos de absorbância nos meios contendo os corantes *tartrazina* (0,52 U); *new coccine* (0,40 U); *orange G* (0,37 U); *amaranto* (0,31 U) e *eriolglaucine* (0,29 U). A cepa C 50 apresentou 0,25 U para meio contendo o corante *eriolglaucine*; 0,20 U para meio contendo *tartrazina*; 0,19 U para meio contendo *amaranto*; 0,15 U para meio contendo *orange G* e 0,13 U para meio contendo *new coccine*. A cepa 7 I apresentou, para meio de cultura contendo o corante *eriolglaucine*, aumento de absorbância de 0,21 U; 0,16 U para meio

contendo *amaranto* e 0,14 U para meio de cultura contendo *orange G*. As cepas AO 30 e A 30 apresentaram aumento de absorvância de 0,18 U para meio de cultura contendo *eriolglaucine*.

Observando-se a figura 5, nota-se que a cepa A 50 apresentou os aumentos de absorvância de 0,37 U; 0,35 U; 0,28 U; e 0,27 U para meios de cultura contendo, respectivamente, os corantes *orange G*, *new coccine*, *tartrazina* e *amaranto*. A cepa C 50 apresentou aumentos de absorvância de 0,46 U para meio contendo *eriolglaucine*; 0,18 U para meio contendo *amaranto*; e 0,16 U para meio contendo *orange G*. Para meio de cultura contendo o corante *orange G*, a cepa 7I apresentou aumento de absorvância de 0,14 U; e de 0,13 U para meio contendo *amaranto*. A cepa A 30 apresentou, para meio de cultura contendo o corante *amaranto*, aumento de absorvância de 0,15 U.

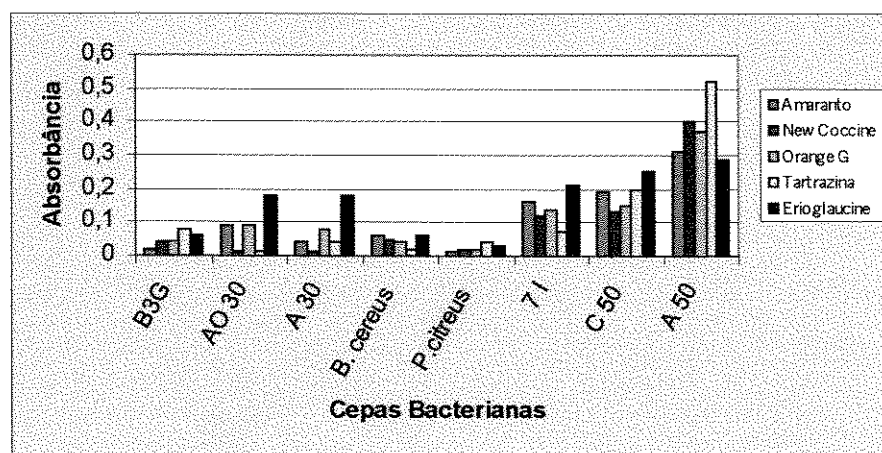


Figura 4: Atividades de emulsificação (aumento de absorvância), frente ao tolueno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por 10 dias, em meio contendo corantes.

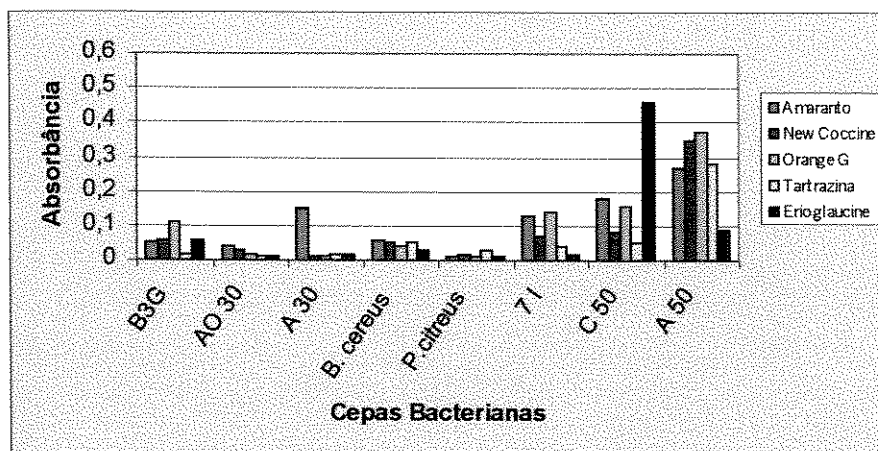


Figura 5: Atividades de emulsificação (aumento de absorbância), frente ao xileno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por 10 dias, em meio contendo corantes.

5.1.2 – Altura dos halos formados na fase oleosa de emulsões tipo A/O

Este teste constituiu na verificação da altura (medida em cm) dos halos formados na fase oleosa das emulsões tipo A/O frente ao tolueno (fig. 6) ou xileno (fig. 7), após vigorosa agitação das soluções. As cepas A 50 e C 50 formaram halos maiores que as demais linhagens em estudo, principalmente frente ao xileno, onde a altura dos halos formados foi superior a 2,5 cm.

Nos meios de cultura líquidos frente ao tolueno (figura 6), a altura dos halos para A 50 oscilou entre 2,4 cm para os corantes *amaranto* e *eriglaucine* e 2,7 cm para o corante *tartrazina*, enquanto que para a cepa C 50, os valores

ficaram entre 2,4 cm para *eriglaucine* e 2,6 cm para *new coccine* e *tartrazina*. Já em meios de cultura líquidos frente ao xileno (figura 7), a altura dos halos formados pela cepa A 50 variou entre 2,6 cm para *new coccine*, *orange G*, *tartrazina* e *eriglaucine* e 2,7 cm para o corante *amaranto*, e pela cepa C 50 variou entre 2,6 cm para *new coccine* e *eriglaucine* e 2,7 cm para *amaranto*, *orange G* e *tartrazina*.

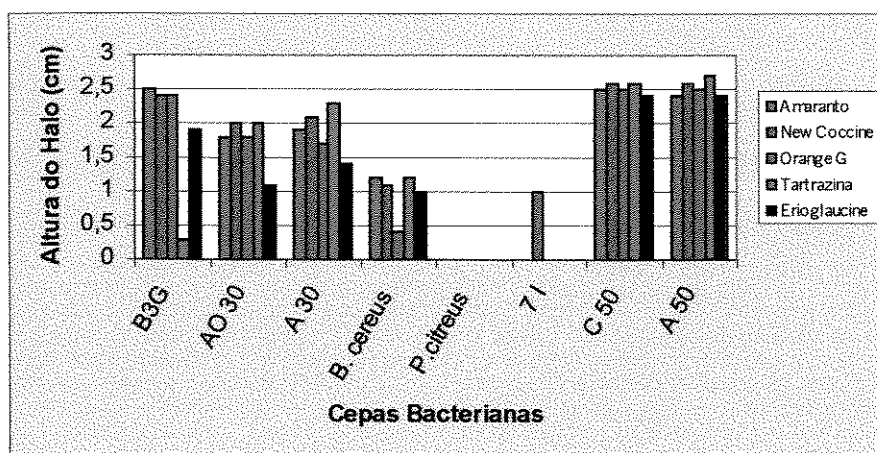


Figura 6: Atividades de emulsificação (altura dos halos), frente ao tolueno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por 10 dias, em meio contendo corantes.

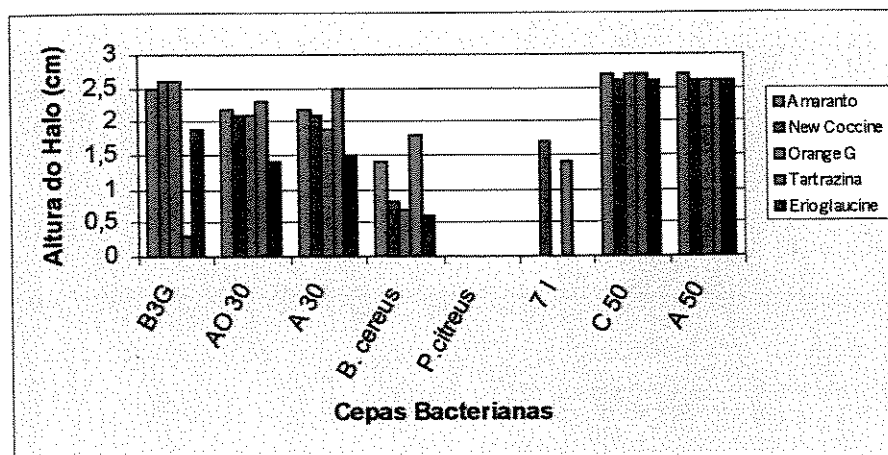


Figura 7: Atividades de emulsificação (altura dos halos), frente ao xileno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por 10 dias, em meio contendo corantes.

5.1.3 – Compactação de bolhas formadas na fase oleosa pelas emulsões tipo água em óleo

De acordo com as figuras 8 e 9, observa-se que o grau máximo de compactação de bolhas (+4) foi obtido pelas linhagens A 50 e C 50, em todas as amostras analisadas. Estes resultados entram em conformidade com os dados obtidos em 5.1.2 e 5.1.1, onde as linhagens A 50 e C 50 mostraram-se melhores produtoras de atividade de biosurfactante que as demais linhagens em estudo.

Os resultados para algumas cepas em estudo mostraram repetibilidade. Em meios de cultura líquidos contendo tolueno ou xileno (figuras 8 e 9, respectivamente) como substratos-teste, a cepa B3G apresentou grau de respectivamente) como substratos-teste, a cepa B3G apresentou grau de

compactação de bolhas (+3) para meios de cultura contendo corantes *amaranto*, *new coccine* ou *orange G*. A cepa *Bacillus cereus* apresentou grau de compactação de bolhas (+3) para meio de cultura contendo o corante *eriloglaucine*. Para meio de cultura frente ao xileno, a cepa AO 30 obteve grau de compactação de bolhas (+3) para meios de cultura contendo os corantes *new coccine*, *orange G* ou *tartrazina*. A cepa A 30 obteve grau de compactação de bolhas (+3) para meios de cultura contendo os corantes *new coccine* e *tartrazina*.

A cepa *Planococcus citreus* não apresentou grau de compactação de bolhas em todas as amostras analisadas.

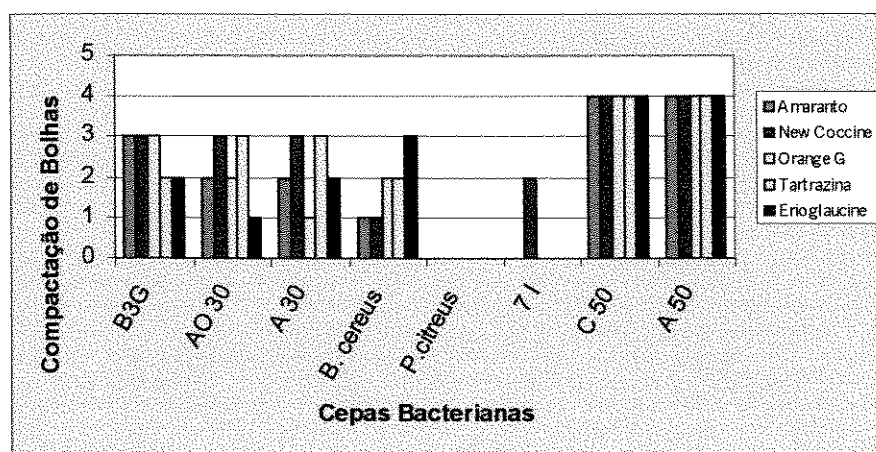


Figura 8: Atividades de emulsificação (compactação das bolhas), frente ao tolueno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por 10 dias, em meio contendo corantes.

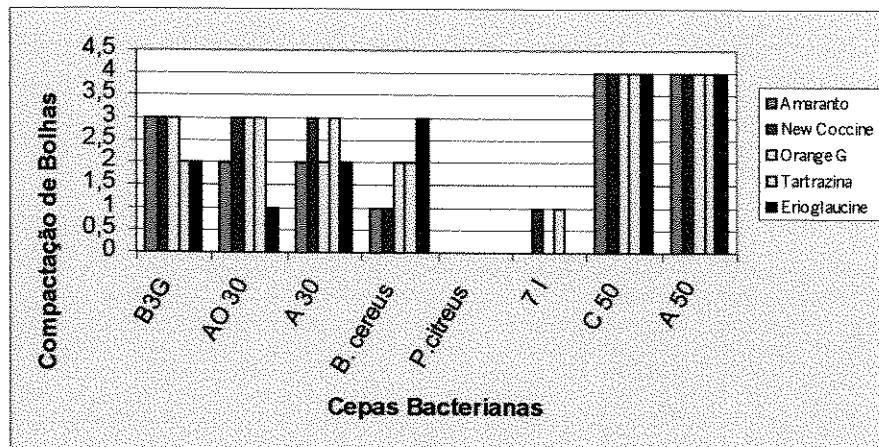


Figura 9: Atividades de emulsificação (compactação das bolhas), frente ao xileno, para oito cepas bacterianas, após crescimento a 55°C, por 10 dias, em meio contendo corantes.

5.2 – Experimentos realizados com as cepas bacterianas selecionadas

Após a seleção das cepas A 50 e C 50 como melhores produtoras de atividade de emulsificação, estudos posteriores foram realizados com estas cepas.

5.2.1 – Variação da massa seca das cepas bacterianas selecionadas

A variação da massa seca para as linhagens A 50 e C 50, durante seu crescimento em meio contendo corantes, pode ser observada através das figuras 10 e 11, respectivamente. Durante a realização dos experimentos, notou-se que a alta temperatura de incubação (55 °C) foi propícia para o crescimento das cepas, o que revela seu caráter termo-tolerante.

De acordo com a figura 10, observou-se um aumento na massa seca até o terceiro dia de incubação da cepa A 50, para meios de cultura contendo os corantes *orange G* (0,0197 g); *eriolglaucine* (0,0190 g); e *tartrazina* (0,156 g). Após este período, houve decréscimo de massa, atingindo 0,0099g para meio contendo *orange G*; 0,0107 g para meio contendo *eriolglaucine*; e 0,0101 g para meio contendo *tartrazina*, no décimo dia de incubação. Para meios de cultura contendo os corantes *amaranto* ou *new coccine*, houve aumento de massa seca da cepa A 50 até o quarto dia de

incubação, sendo 0,0213 g e 0,0188 g, respectivamente. Seguiu-se um período de declínio até o décimo dia de incubação, finalizando com 0,0087 g de massa seca da cepa A 50 para meio de cultura contendo *amaranto* e 0,0104 g para meio contendo *new coccine*.

Conforme figura 11, observa-se que para os meios de cultura contendo os corantes *new coccine*, *orange G* ou *eriglaucine* houve aumento de massa seca da cepa C 50 até o terceiro dia de incubação (0,0184 g, 0,0213 g e 0,0238 g, respectivamente), seguido de declínio até o décimo dia (0,0095 g para meio contendo *new coccine*, 0,0097 g para meio contendo *orange G* 0,0119 g para meio contendo *eriglaucine*). Para o meio de cultura contendo o corante *amaranto* observou-se crescimento máximo da cepa C 50 no quarto dia de incubação (0,0202 g), decrescendo até o décimo dia (0,0109 g). Para o meio de cultura contendo o corante *tartrazina*, o crescimento da cepa C 50 ocorreu até o quinto dia (0,0160 g), declinando até o décimo dia de incubação (0,0098 g).

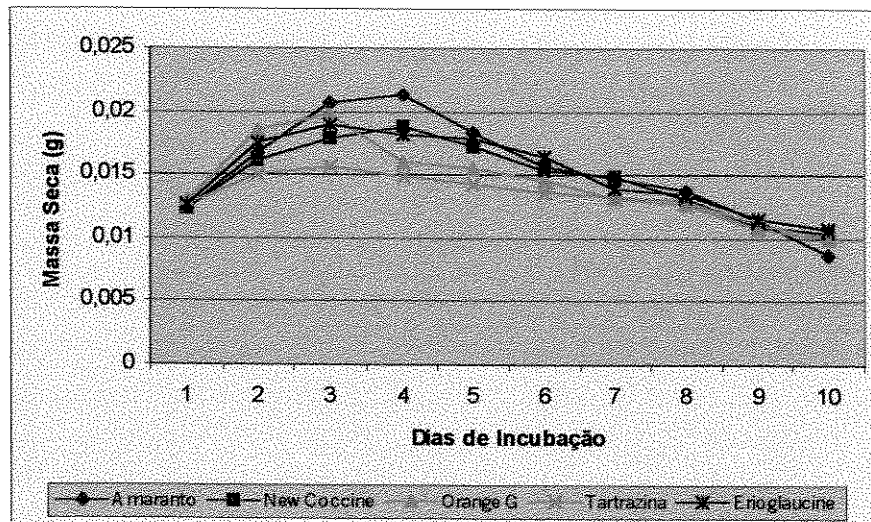


Figura 10: Variação de massa seca para a linhagem A 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

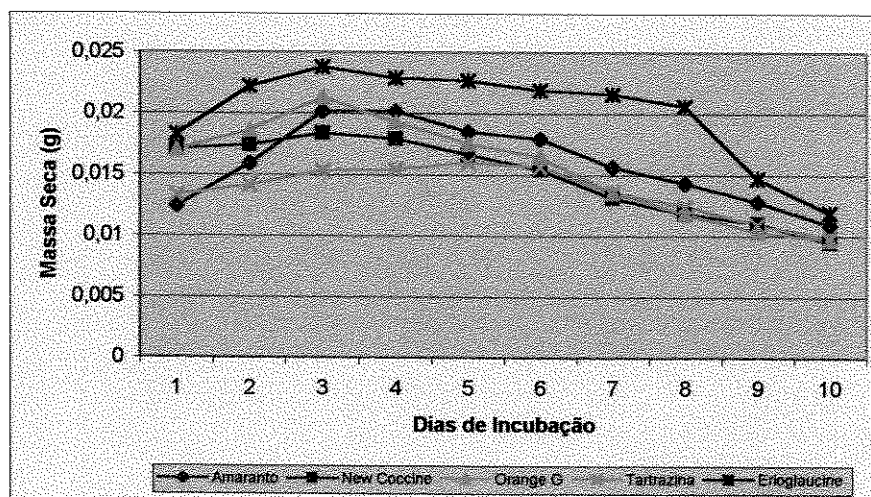


Figura 11: Variação de massa seca para a linhagem C 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

5.2.2 – Variação do pH para meios contendo corantes artificiais durante o crescimento das cepas bacterianas selecionadas

As cepas bacterianas selecionadas foram cultivadas em meio com pH inicial 6,5. Observando-se as figuras 12 e 13, nota-se que os valores de pH obtidos durante os dez dias de crescimento das cepas A 50 e C 50 mantiveram-se acima do pH inicial do meio, permanecendo em torno da neutralidade. Este fato pode ter ocorrido porque meios de cultura sob ação microbiana permanecem em torno da neutralidade, ou leve acidez, devido a liberação de produtos do metabolismo bacteriano, o que torna o meio apropriado para melhor desenvolvimento do microrganismo JACOBUCCI (2000). Outra explicação entra em conformidade com o trabalho clássico de KOSARIC *et al.* (1987), citando que temperatura e pH são fatores de grande importância na síntese de biosurfactantes, podendo estes fatores variar grandemente devido às necessidades de cada microrganismo: a modificação de pH do meio para níveis que facilitem a atividade de emulsificação são estratégias utilizadas por microrganismos para aumentar a produção de biosurfactantes.

Para meio de cultura contendo os corantes *amaranto*, *new coccine*, *orange G*, *tartrazina* ou *erioquelavina*, a cepa A 50 (figura 12) apresentou, respectivamente, os valores de pH 6,8; 7,1; 7,1; 6,9 e 6,9 no primeiro dia de crescimento, e respectivamente os valores 7,0; 7,1; 6,9; 7,1 e 7,1 no décimo dia. A cepa C 50 (figura 13) apresentou, para os mesmos corantes, os

respectivos valores de pH 6,9; 7,0; 7,0; 6,8 e 6,7 no primeiro dia de crescimento, variando para 7,0; 6,9; 6,9; 6,9 e 7,0 no décimo dia.

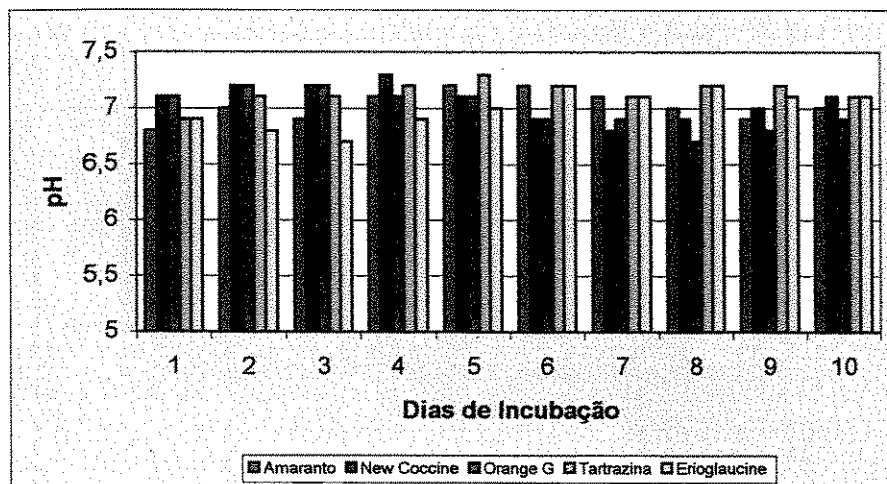


Figura 12: Variação do pH para a linhagem A 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

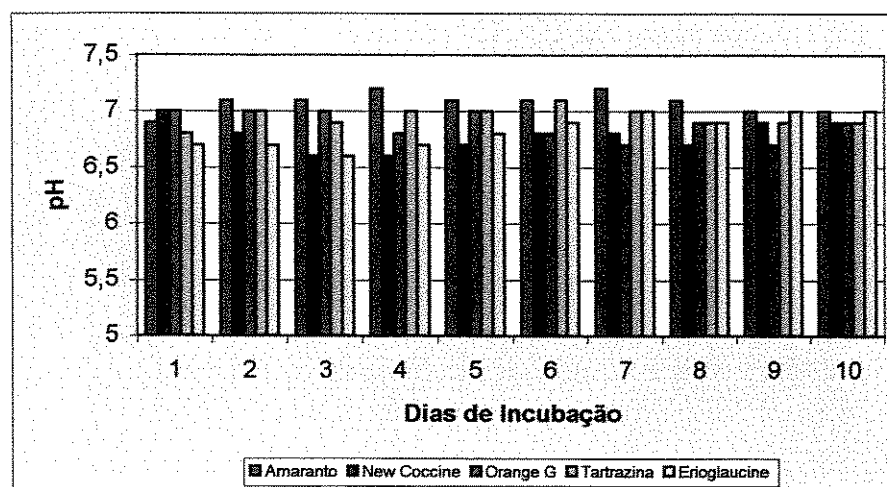


Figura 13: Variação do pH para a linhagem C 50, cultivada em meio contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

5.2.3 – Determinação de emulsões tipo O/A formadas através do crescimento das cepas bacterianas selecionadas em meio contendo corantes sintéticos

Atividade de emulsificação tipo O/A foi testada para duas linhagens bacterianas selecionadas, A 50 e C 50, frente ao tolueno ou xileno (fig. 14 a 17).

De uma maneira geral, observou-se um aumento na atividade de emulsificação nos meios contendo cinco corantes sintéticos, a partir do segundo dia de crescimento das cepas bacterianas. Esta verificação entra em conformidade com o trabalho clássico de ZAJIC e SMITH (1987), que observaram que grande atividade de emulsificação foi obtida a partir do segundo dia de crescimento de cepas bacterianas em sistemas onde eram utilizados tolueno e água, com adição de biosurfactante à fase aquosa.

De acordo com a figura 14, o meio de cultura contendo o corante *tartrazina* apresentou valores de absorbância crescentes até o terceiro dia de crescimento da cepa A 50 (0,51 U), permanecendo estável até o décimo dia (0,53 U). Para o meio de cultura contendo o corante *orange G*, a atividade de emulsificação atingiu o valor máximo no terceiro dia de crescimento da cepa (0,37 U), permanecendo estável até o décimo dia de crescimento (0,36 U). Para meio com acréscimo de *erio Glaucine*, observou-se variação nos valores de absorbância entre 0,18 e 0,28 U do primeiro para o segundo dias de crescimento, permanecendo estáveis até o décimo dia (0,28 U). Meio de

cultura contendo o corante *new coccine* apresentou valor de absorvância de 0,41 U no terceiro dia de crescimento, com estabilidade até o décimo dia de crescimento da cepa (0,38 U). O meio de cultura contendo o corante *amaranto* apresentou aumento de absorvância (0,35 U) até o quinto dia de crescimento da cepa, com estabilidade até o décimo dia (0,31 U).

Na figura 15 observa-se que meio de cultura contendo o corante *eriolgaucine* apresentou valor de absorvância de 0,27 U no quinto dia de crescimento da cepa C 50, mantendo valores estáveis até o décimo dia (0,25 U). Para meio de cultura contendo o corante *amaranto* observou-se valores crescentes de absorvância durante os dez dias de crescimento da cepa bacteriana (de 0,10 para 0,21 U). O meio de cultura contendo *new coccine* apresentou valor de absorvância de 0,15 U no segundo dia de crescimento, mantendo valores estáveis até o décimo dia (0,14 U). O meio de cultura contendo *tartrazina* apresentou valor máximo de absorvância no quarto dia de crescimento da cepa (0,23 U), mantendo valores estáveis até o décimo dia (0,21 U). Para meio de cultura contendo *orange G* foi observado valor de 0,15 U no terceiro dia de crescimento da cepa bacteriana, seguido de estabilidade até o décimo dia (0,15 U).

Conforme figura 16, para meio de cultura com acréscimo de *orange G* observa-se valor máximo de absorvância de 0,39 U no quinto dia de crescimento da cepa A 50, que decresce até o décimo dia de incubação da cepa (0,35 U). Para meio contendo *new coccine* verifica-se valor de 0,34 U no quarto dia de crescimento da cepa, mantendo estabilidade até o décimo dia de crescimento da cepa A 50 (0,32 U). O meio de cultura contendo o corante

eriglaucine apresentou seu valor máximo no quarto dia de crescimento da cepa (0,09 U), permanecendo estável até o décimo dia (0,09 U). O meio de cultura contendo o corante *tartrazina* apresentou valor de absorbância de 0,29 U no terceiro dia de crescimento da cepa, mantendo valores estáveis até o décimo dia (0,26 U). O meio de cultura contendo *amaranto* apresentou valor de absorbância de 0,27 U no segundo dia de crescimento da cepa, com estabilidade até o décimo dia (0,25 U).

Conforme a figura 17, para meio com acréscimo de *eriglaucine*, observou-se valor máximo de absorbância no quarto dia de crescimento da cepa C 50 (0,45 U), com estabilidade até o décimo dia (0,43 U). Para meio de cultura com acréscimo de *amaranto*, verificou-se valor máximo de absorbância no quarto dia de crescimento da cepa C 50 (0,20 U), com estabilidade até o décimo dia (0,20 U). Meios de cultura contendo os corantes *tartrazina*, *new coccine* e *orange G*, apresentaram valores de absorbância estáveis a partir do segundo dia de crescimento da cepa bacteriana (0,04 U; 0,08 U e 0,16U, respectivamente).

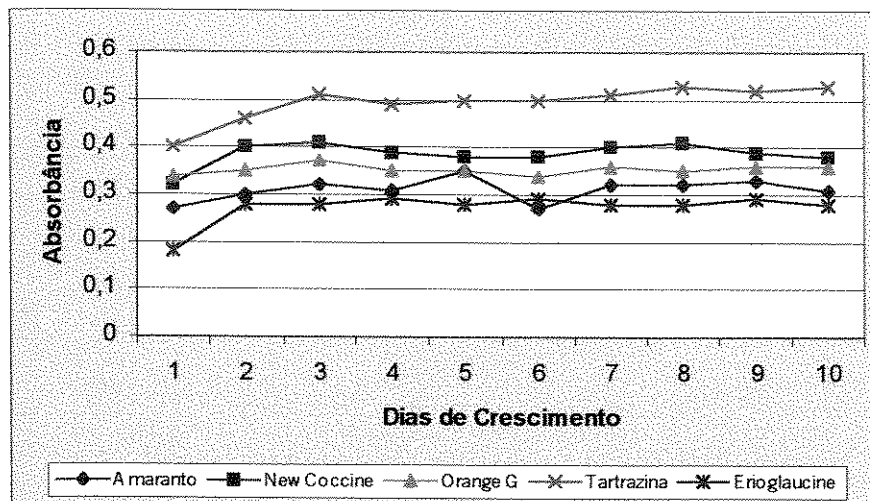


Figura 14: Atividade de emulsificação (O/A) frente ao tolueno, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

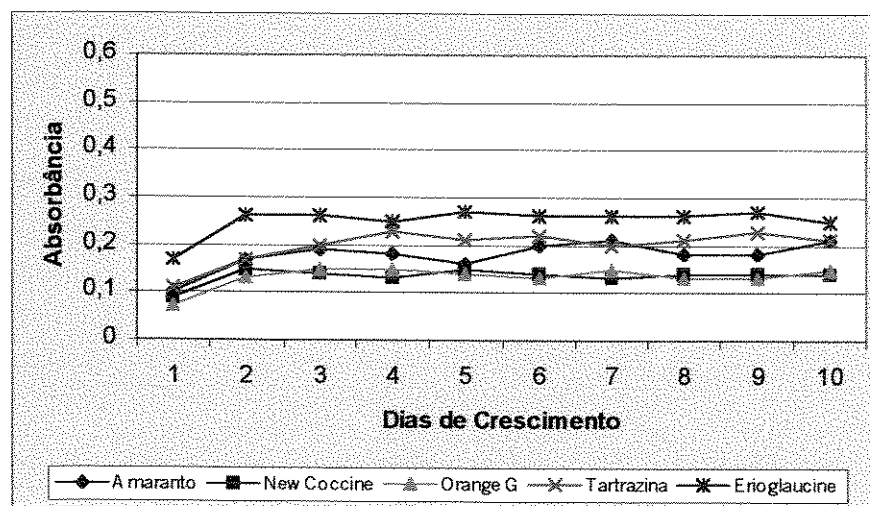


Figura 15: Atividade de emulsificação (O/A) frente ao tolueno, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

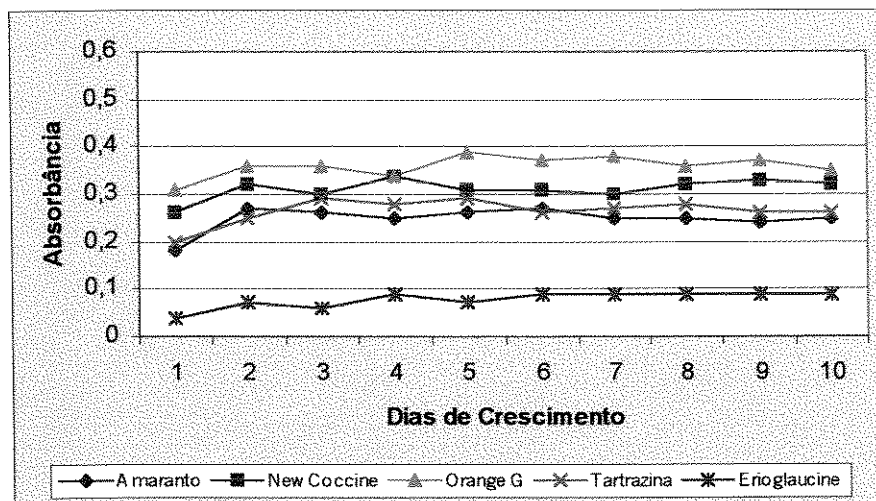


Figura 16: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de absorbância, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

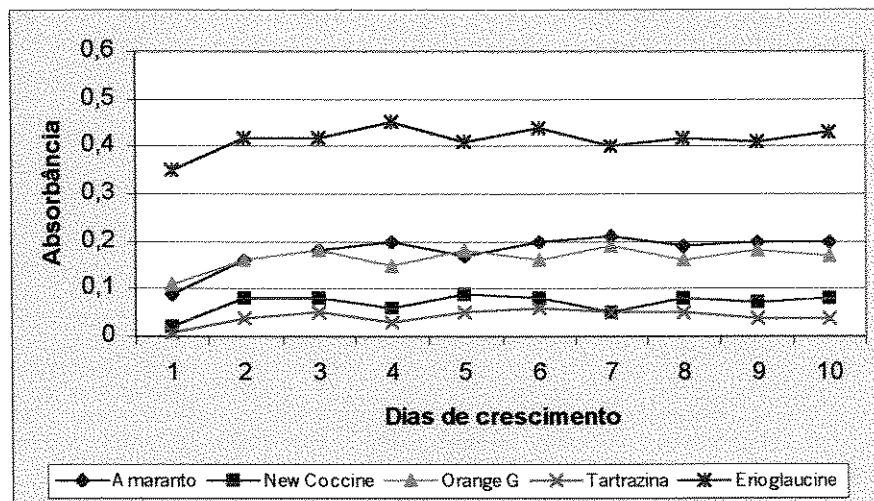


Figura 17: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de absorbância, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

5.2.4 – Altura dos halos formados na fase oleosa dos caldos de cultura após crescimento das cepas bacterianas selecionadas

Após acréscimo de tolueno ou xileno aos caldos de cultura, seguido de vigorosa agitação em Vortéx, observou-se formação de bolhas na fase oleosa de todas as amostras analisadas, devido à presença de biosurfactante produzido pelas cepas A 50 e C 50. De acordo com as figuras 18 a 21, a partir do segundo dia de crescimento das cepas bacterianas A 50 e C 50, a altura dos halos formados foi igual ou superior a 2,1 cm para todas as amostras analisadas. Observou-se ainda que, a partir do segundo dia de crescimento das cepas em meio de cultura contendo corantes sintéticos, a altura dos halos foi sempre superior à altura dos hidrocarbonetos (2 cm) utilizados na constituição da fase oleosa.

Conforme figura 18, os meios de cultura contendo os corantes *amaranto*, *new coccine* ou *eriolgaucine* apresentaram altura máxima de halos, respectivamente, no oitavo (2,5 cm), nono (2,6 cm) e quinto (2,5 cm) dias de crescimento da cepa A 50. Para meio de cultura contendo *orange G* a altura máxima de halo (2,5 cm) foi observada no oitavo e décimo dias de crescimento da cepa bacteriana. Para meio de cultura contendo *tartrazina* observou-se a formação de halo com 2,6 cm de altura no quarto, nono e décimo dias de crescimento.

Conforme figura 19, os meios de cultura contendo os corantes *new coccine* e *orange G* apresentaram altura máxima de halos no sexto dia de

crescimento da cepa C 50 (2,6 cm e 2,5 cm, respectivamente). Para meio de cultura contendo *tartrazina* a altura máxima de halo (2,6 cm) ocorreu no terceiro e sexto dias de crescimento da cepa bacteriana. O meio de cultura contendo o corante *amaranto* apresentou 2,5 cm de altura máxima de halo no sexto, nono e décimo dias de crescimento da cepa C 50. Para meio de cultura com acréscimo do corante *eriolglaucine* observou-se formação de halo com 2,4 cm de altura no sexto e décimo dias de crescimento da cepa bacteriana.

Conforme figura 20, os meios de cultura contendo os corantes *new coccine*, *tartrazina* e *eriolglaucine* apresentaram altura máxima de halos, respectivamente, no décimo (2,6 cm), quinto (2,5 cm) e quarto (2,7 cm) dias de crescimento da cepa A 50. Para meio de cultura contendo *orange G* a altura máxima de halo (2,6 cm) foi observada no quarto e nono dias de crescimento da cepa bacteriana. Para meio de cultura contendo *amaranto* foi formado halo com 2,5 cm de altura no terceiro, quarto, nono e décimo dias de crescimento da cepa.

Conforme figura 21, o meio de cultura contendo o corante *new coccine* apresentou altura máxima de halo (2,6 cm) no quarto dia de crescimento da cepa C 50. Para meio de cultura contendo *tartrazina* observou-se altura máxima de halo (2,5 cm) no nono dia de crescimento da cepa bacteriana. Para meio de cultura contendo o corante *amaranto* observou-se 2,7 cm de altura máxima de halo no oitavo dia de crescimento da cepa. O meio de cultura contendo o corante *orange G* apresentou formação de halo com 2,6 cm de altura no sexto dia de crescimento da cepa. Meio de cultura contendo o

corante *eriolglaucine* apresentou 2,6 cm de altura máxima de halo no oitavo e décimo dias de crescimento da cepa bacteriana.

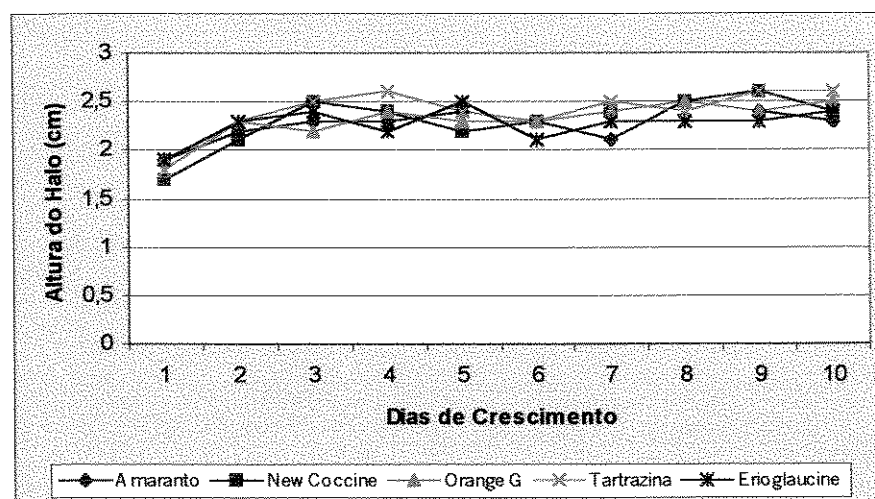


Figura 18: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

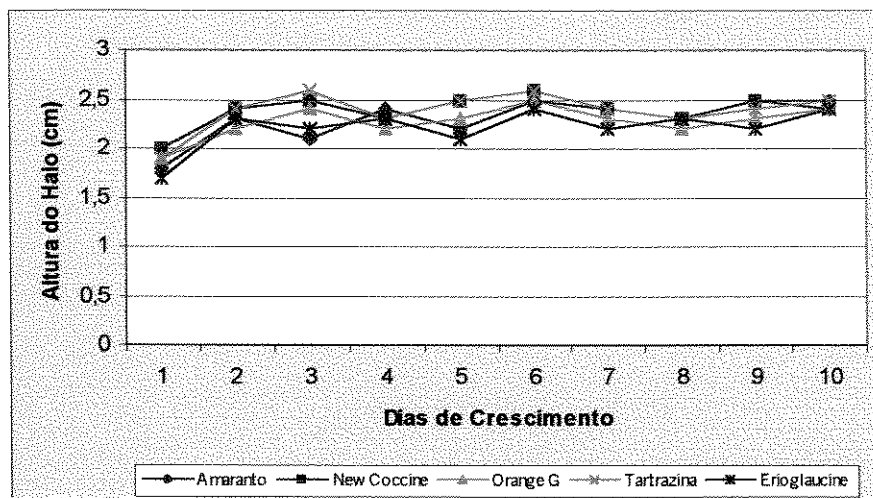


Figura 19: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem C50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

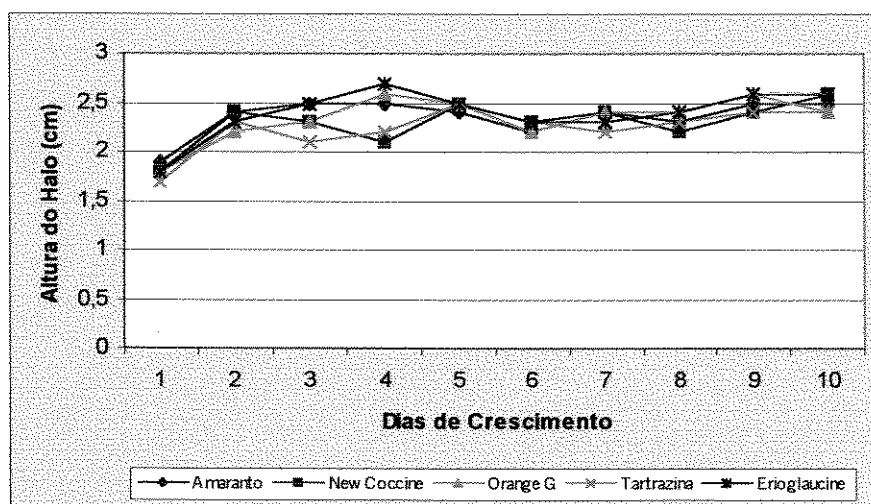


Figura 20: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

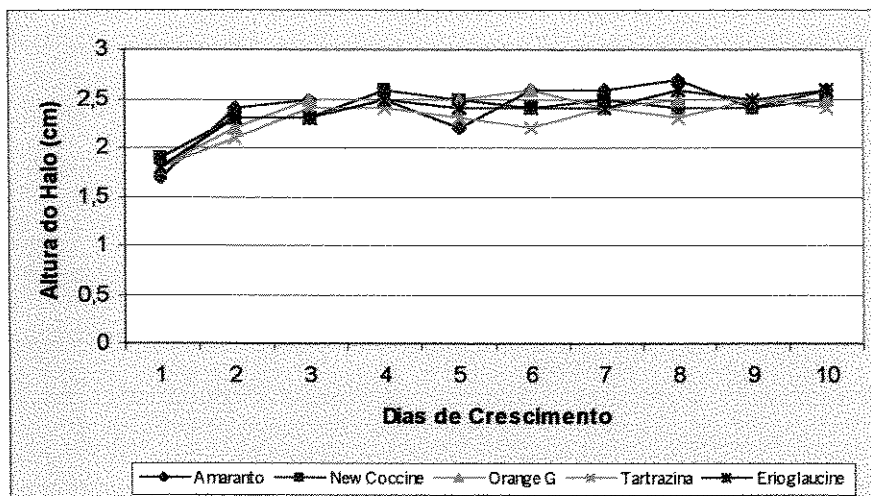


Figura 21: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de altura de halos, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

5.2.5 – Nível de compactação de bolhas formadas na fase oleosa dos caldos de cultura

No primeiro dia de crescimento das cepas bacterianas A 50 e C 50 em meio contendo corantes sintéticos, o grau de compactação de bolhas obtido após vigorosa agitação dos caldos de cultura frente ao tolueno (fig. 22 e 23) e frente ao xileno (fig. 24 e 25) foi (+3) para a maioria das amostras analisadas. A partir do segundo dia de crescimento das cepas, o nível máximo de compactação de bolhas (+4) foi atingido, permanecendo estável até o décimo dia incubação das cepas bacterianas, cultivadas em meio contendo corantes sintéticos (azo ou triarilmetanos).

Estes dados entram em conformidade com estudos clássicos de KOSARIC *et al.* (1987), onde foi observado que a maioria dos microrganismos produtores de biosurfactante necessitam de hidrocarbonetos como fonte de carbono para a síntese de biosurfactantes, mas existem exceções, como é o caso de *Bacillus subtilis*, que cresce em meios desprovidos de hidrocarboneto como única fonte de carbono, produzindo surfactina.

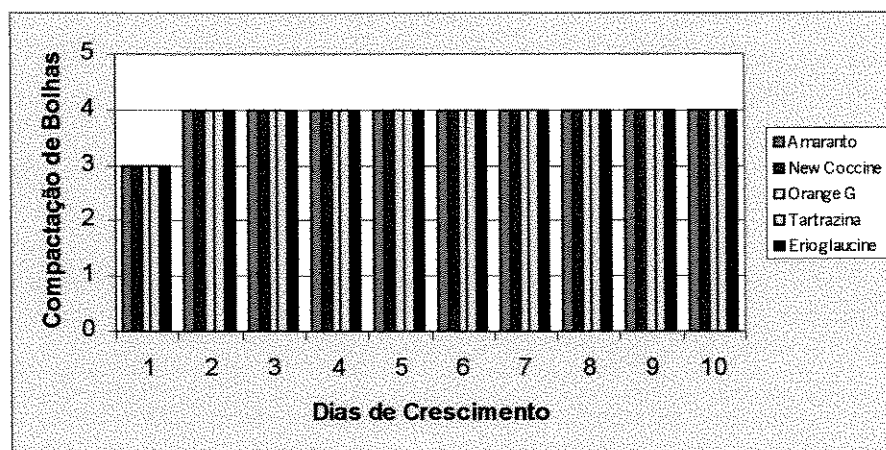


Figura 22: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

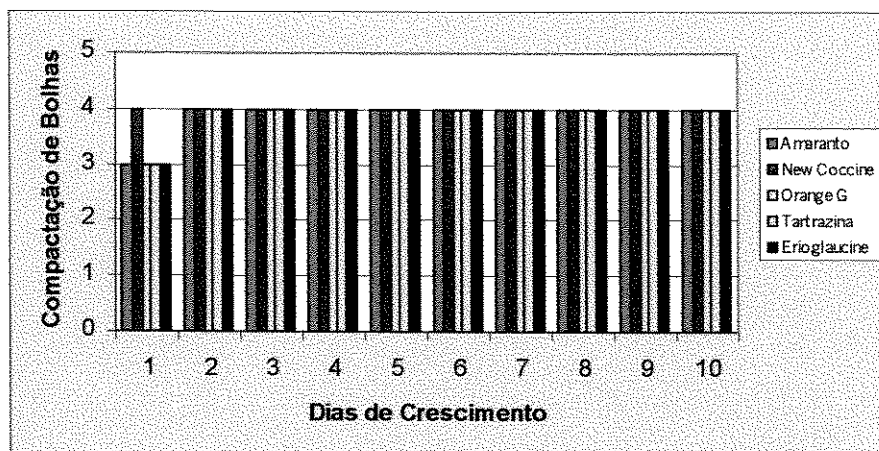


Figura 23: Atividade de emulsificação frente ao tolueno, em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

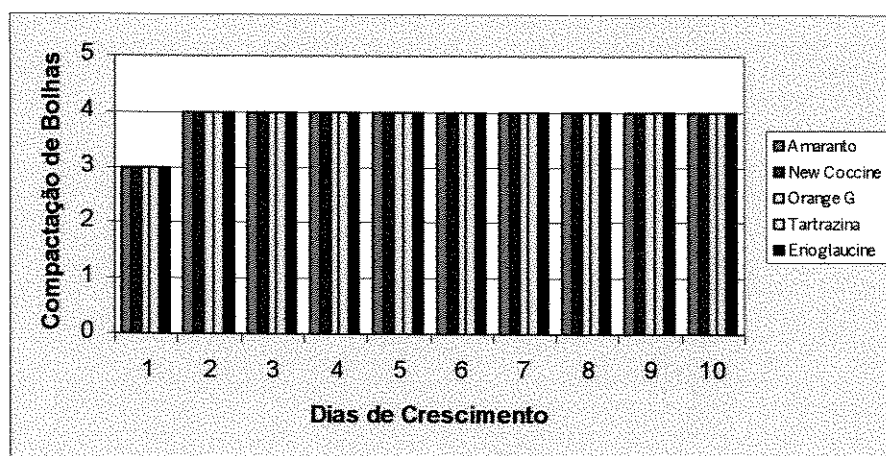


Figura 24: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem A 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

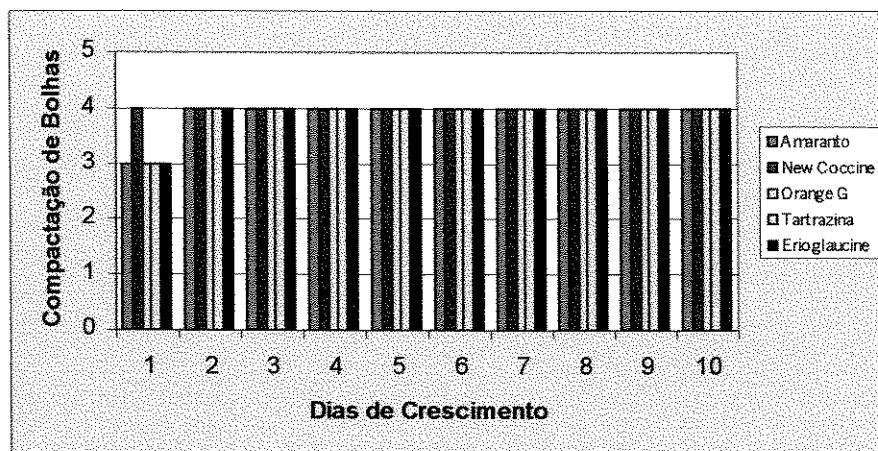


Figura 25: Atividade de emulsificação frente ao xileno, em termos de compactação de bolhas, durante o crescimento da linhagem C 50, em meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

5.2.6 – Valores de absorbância obtidos através de leitura espectrofotométrica dos caldos de cultura

A análise para verificação da descoloração dos caldos de cultura pela ação das cepas bacterianas de interesse foi efetuada através de varredura em espectrofotômetro em dois comprimentos de ondas (máximo e mínimo), segundo GLENN & GLOD (1983).

Os dados obtidos (fig.26 a 30) são a razão entre abs max/min dos caldos de cultura, obtidas através de espectrofotometria (UV – Visível), que apresentam constância ou pouca modificação, o que indica adsorção dos corantes artificiais presentes no meio pelo micélio das cepas bacterianas A 50

e C 50, em conformidade com o trabalho clássico de GLENN & GOLD (1983), que cita que a taxa de descoloração em comprimentos de ondas pré-selecionados para uma avaliação espectrofotométrica do sobrenadante de culturas microbianas formadas por basidiomicetos (200/800 nm), permitiu a observação de significativas mudanças espectrais. No caso de *Phanerochaete chrysosporium*, observou-se que a adsorção do corante ao micélio do fungo é a responsável pela aparente descoloração ocorrida, e esta pode ser observada quando ocorrem grandes mudanças na razão de absorbância entre dois comprimentos de ondas escolhidos. O decréscimo proporcional dos valores de absorbância indica a adsorção, que também pode ser evidenciada pela inspeção da massa micelial: as células que adsorvem corantes tornam-se densamente coloridas, enquanto que as que causam degradação dos corantes permanecem com sua coloração natural inicial.

De acordo com a figura 26, percebe-se decréscimo nos valores de atividade de emulsificação, para o caldo de cultura inoculado com a cepa C 50, a partir do terceiro dia de incubação (10,069) até o décimo dia (7,781). O caldo de cultura inoculado com a cepa A 50 apresentou valores decrescentes de atividades de emulsificação do primeiro dia de incubação (9,019) em relação ao décimo dia (7,552).

Observando-se a figura 27, verifica-se decréscimo nos valores de atividade de emulsificação entre o primeiro e o décimo dia de incubação do caldo de cultura inoculado com a cepa C 50 (de 8,186 para 6,445). Para o caldo de cultura inoculado com a cepa A 50, houve diminuição de valores de

atividade de emulsificação do primeiro (7,821) ao décimo dia (5,736) de incubação.

Conforme vê-se na figura 28, houve aumento nos valores de atividade de emulsificação apresentados pelo caldo de cultura inoculado com a cepa C 50 do primeiro dia de crescimento (1,153) ao quarto dia (1,464), decrescendo para 1,346 no décimo dia. O caldo de cultura inoculado com a cepa A 50 apresentou decréscimo nos valores de atividade de emulsificação do primeiro ao décimo dias de incubação (de 1,514 para 1,256).

A figura 29 mostra decréscimo de valores de atividade de emulsificação do primeiro (1,516) ao décimo dias (1,163) de crescimento do caldo de cultura inoculado com a cepa C 50. O caldo de cultura inoculado com a cepa A 50 apresentou decréscimo nos valores de absorbância do primeiro (1,540) ao décimo (1,279) dias de incubação da cepa.

Através da figura 30 observa-se diminuição dos valores de atividade de emulsificação para o caldo de cultura inoculado com a cepa C 50 do primeiro ao décimo dias de incubação (8,767 a 6,667). O caldo de cultura inoculado com a cepa A 50, apresentou decréscimo nos valores de atividade de emulsificação do primeiro (13,333) ao décimo (6,575) dias de crescimento da cepa.

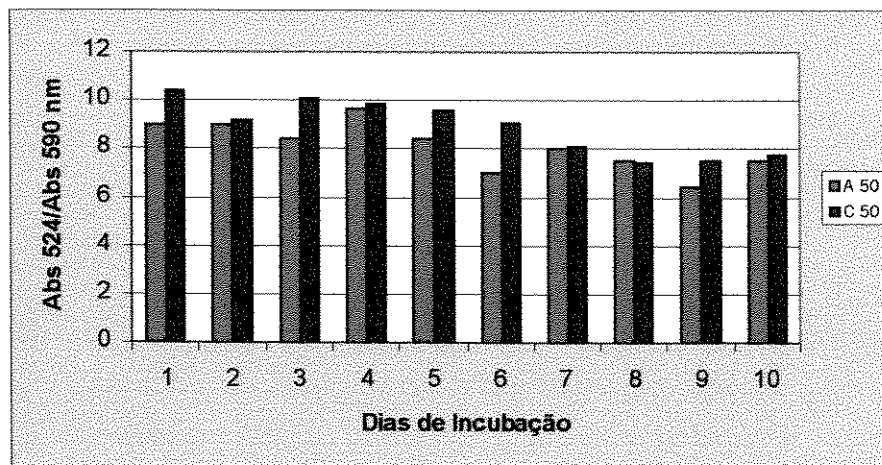


Figura 26: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (524/590 nm) para o corante *amaranto*, artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.

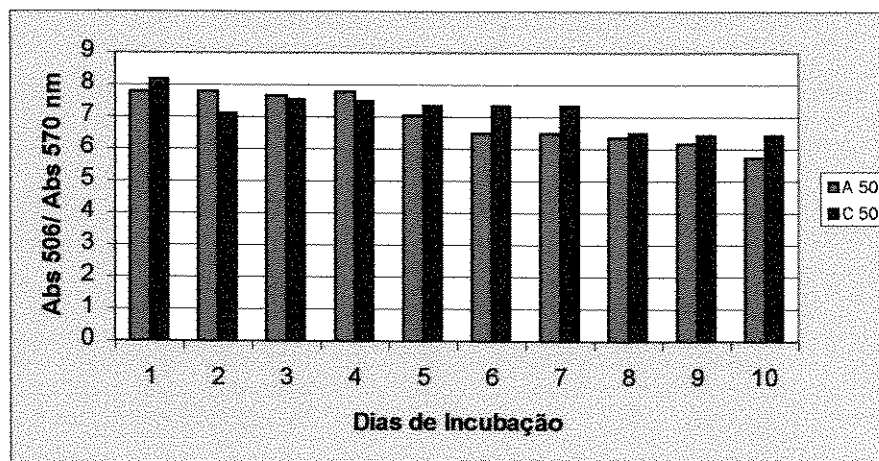


Figura 27: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (506/570 nm) para o corante *new coccine*, artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.

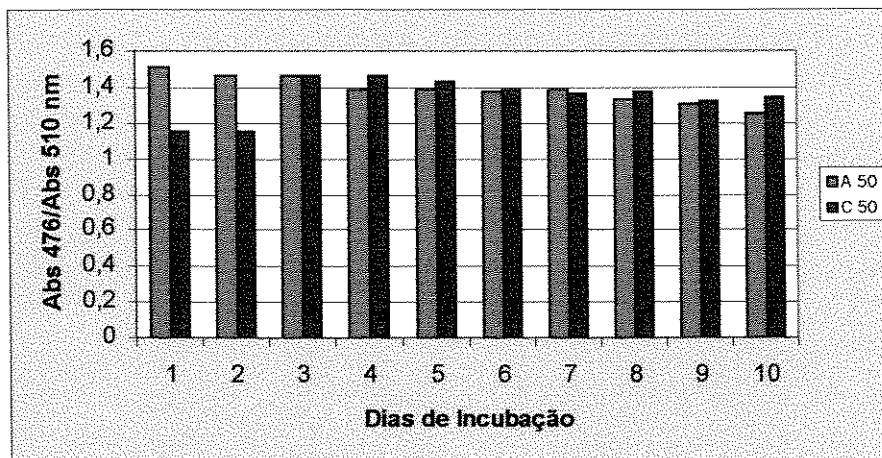


Figura 28: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (476/510 nm) para o corante *orange G*, artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.

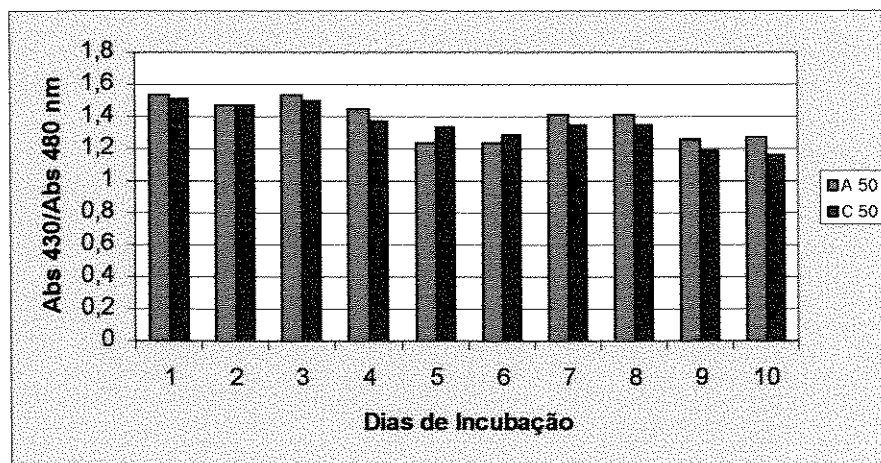


Figura 29: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (430/480 nm) para o corante *tartrazina*, artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.

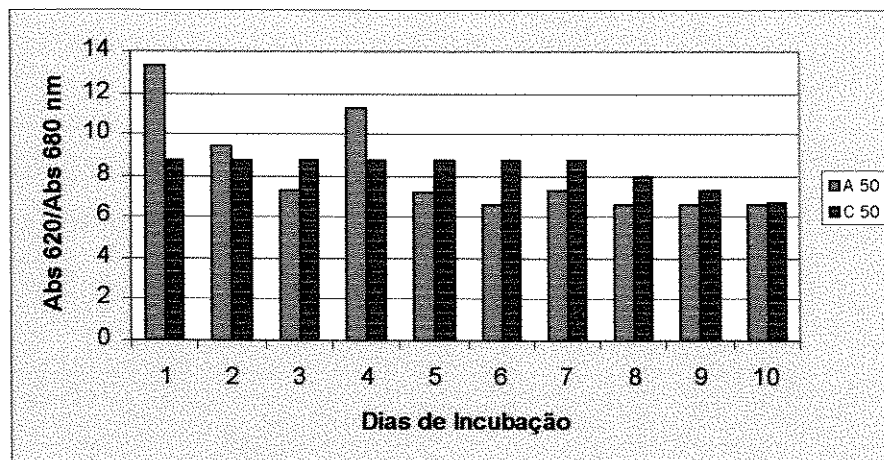


Figura 30: Determinação da absorbância através dos comprimentos de ondas máximo e mínimo (620/680 nm) para o corante *eriglaucine*, artificial e hidrossolúvel, sob ação das cepas bacterianas A 50 e C 50.

A comparação dos dados obtidos através de testes bioquímicos, apresentados na tabela 1, e sob consulta ao Bergey's Manual, fonte utilizada para obtenção dos próprios testes, mostra grande incongruência de resultados.

Tabela 1: Testes bioquímicos para identificação da cepa bacteriana A 50.

Testes bioquímicos	A 50
KOH	Gram + (KOH negativo)
Catalase	Catalase negativo
Oxidase	Oxidase positivo
Esporulação	Sim
TSI	Base alcalina (vermelha)/Ápice alcalino
Agar Citrato	Negativo
OF aberto	Negativo
OF fechado	Negativo

Fonte: Testes bioquímicos obtidos através de BUCHANAN *et al.* (1974).

De acordo com a tabela de identificação para Kit API 50 CHB, a cepa C 50 apresentou 84,6% de certeza na identificação da linhagem *Bacillus subtilis*.

Em trabalho anterior (NEVES, 2002), o Kit API 50 CHB foi utilizado para identificar dois tipos de linhagens bacterianas, *Bacillus cereus* e *Bacillus sphaericus*.

Tabela 2: Resultados obtidos através do Kit API 50 CHB – *Bacillus*, para linhagem C 50.

Açúcares	Leitura (mudança de coloração) 24 h	Açúcares	Leitura (mudança de coloração) 24 h
0 – Controle	-	25 – Esculina	+
1 – Glicerol	+	26 – Salicina	+
2 – Eritrol	-	27 – Celobiose	+
3 – D – arabinose	-	28 – Maltose	+
4 – L – arabinose	+	29 – Lactose	-
5 – Ribose	+	30 – Melobiose	+
6 – D – xilose	+	31 – Sacarose	+
7 – L – xilose	-	32 – Trealose	+
8 – Adonito	-	33 – Inulina	-
9 – 8 Metil-D-xilosidase	-	34 – Melizitose	+
10 – Galactose	-	35 – Rafinose	+
11 – Glicose	+	36 – Amido	+

Tabela 2: continuação.

12 – Frutose	+	37 – Glicogênio	-
13 – Manose	+	38 – Xilitol	-
14 – Sorbose	-	39 – Gentiobiose	-
15 – Ramnose	-	40 – D-Turanose	-
16 – Dulcitol	-	41 – D-Lixose	-
17 – Inositol	-	42 – D-Tagatose	-
18 – Manitol	+	43 – D-Fucose	-
19 – Sorbitol	-	44 – L-Fucose	-
20 – α -Metil-D-manosidase	-	45 – D-Arabitol	-
21 - α -Metil-D-glicosidase	-	46 – L-Rabitol	-
22 – N Acetil glucosamida	-	47 – Gluconato	-
23 – Amigdalina	-	48 – 2 Ceto-gluconato	-
24 – Arbutina	+	49 – 5 Ceto-gluconato	-

6 – CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível observar qual o melhor comportamento entre oito cepas bacterianas (B 3 G, AO 30, A 30, *Bacillus cereus*, *Planococcus citreus*, 7 I, C 50 e A 50), em relação à produção de biosurfactantes, quando inoculadas em um meio de crescimento líquido, rico em sais, e com a adição de cinco tipos de corantes, artificiais e hidrossolúveis, *amaranto*, *new coccine*, *orange G*, *tartrazina* (corantes azo), e *eriolglaucine* (triarilmetano). Através dos resultados obtidos, concluiu-se que as cepas A 50 e C 50 são produtoras de biosurfactante com maior atividade de emulsificação (tipo água em óleo e óleo em água) que as demais cepas investigadas neste trabalho.

Com base nisto, análises posteriores foram realizadas. Através destas, monitorou-se a atividade de biosurfactante a cada 24 horas de incubação das cepas selecionadas, bem como a capacidade de descoloração dos corantes artificiais. Com base no decréscimo proporcional dos valores de absorbância, ocorrido para as cepas A 50 e C 50, e leve coloração apresentada pelas mesmas após incubação a 55°C e sob agitação a 150 rpm, durante dez dias, conclui-se que os corantes artificiais *amaranto*, *new coccine*, *orange G*, *tartrazina* e *eriolglaucine*, contidos nos meios de cultura líquidos nos quais as cepas foram inoculadas, ficaram adsorvidos em suas estruturas celulares.

A identificação da cepa bacteriana C 50 foi realizada de acordo com os resultados obtidos através do Kit API 50 CHB – *Bacillus*, indicando 84,6% de certeza em sua identificação como sendo *Bacillus subtilis*.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDRICH HANDBOOK OF FINE CHEMICALS AND LABORATORY EQUIPMENT, 2000-2001. 2065 p.
2. AL-SABTI, K. Chlorotriazine Reactive Azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.47, p.149-155, 2000.
3. AZMI, W.; SANI, R. K.; BANERJEE, U. C. Biodegradation of triphenylmethane dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p. 185-191, 1998.
4. BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p.217-227, 1996.
5. BELOTE, J. G. **Utilização de basidiomicetos lignolíticos na degradação de corantes industriais, naturais e no tratamento do efluente de uma indústria de alimentos**. Campinas, 2000. 105 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
6. BERZAS, J. J.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V.; FARINAS, N. R. Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of tartrazine, patent

blue V and indigo carmine in commercial products. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, p. 353-364, 1999.

7. 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.
8. BOLEY, N. P.; BUNTON, N. G.; CROSBY, N. T.; JOHNSON, A. E.; ROPER, P.; SOMERS, L. Determination of synthetic colours in food using high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 105, p. 589-599, 1980.
9. BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E.; COWAN, S. T.; HOLT, J. G.; LISTON, J.; MURRAY, R. G. E.; NIVEN, C. F.; RAVIN, A. W.; STAINER, R. Y. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. The Williams 7 Wilkins Company, 1974, 1246p.
10. CAO, W.; MAHADEVAN, B.; CRAWFORD, D. L.; CRAWFORD, R. L. Characterization of an extracellular azo dye-oxidizing peroxidase from *Flavobacterium* sp. ATCC 39723. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.810-817, 1993.
11. CAPITÁN-VALLVEY, L. F.; FERNÁNDEZ, M. D.; ORBE, I. de; AVIDAD, R. Simultaneous determination of the colorants tartrazine, ponceau 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid phase

spectrofotometry using partial least squares multivariate calibration.
Talanta, v. 47, p.861-868, 1998.

12. CATÁLOGO ICN: biochemicals, labware, cell biology, immunobiologicals, neurochemicals, molecular biology and radiochemicals, 1998. 2240 p.
13. CATÁLOGO MERCK: Reagents, Chemicals and Diagnostics, 1996. 1344 p.
14. CODEX ALIMENTARIUS: General Requirements, 1992. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization, v. 1. 337 p.
15. COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p.224-229, 1987.
16. CRIPPS, C.; BUMBUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1114-1118, 1990.
17. CHUNG, K. T.; STEVENS, B. J. Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminthes. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 12, p.2121-2132, 1993.

18. FARBSTOFF-KOMMISSION. **Farbstoffe für lebensmittel: deutsche forschungsgemeinschaft.** 3. edição revisada. 1988.
19. GLENN, J. K. ; GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, n.6, p. 1741-1747, 1983.
20. HAUG, W.; SCHMIDT, A.; NORTEMANN, B.; HEMPEL, C. D.; STOLTZ, A.; KNACKMUSS, H. J. Mineralization of the sulfonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.3144-3149, 1991.
21. JACOBucci, D. F. C. **Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos.** Campinas, 2000. 89 p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
22. KECK, A.; KLEIN, J.; KUDLICH, M.; STOLZ, A.; KNACKMUSS, H.; MATTES, R. Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic Acid Degradation Pathway of *Sphingomonas sp.* strain BN6. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3684-3690, 1997.

23. KIRBY, N.; MC MULLAN, G.; MARCHANT, R. Decolourization of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 7, p. 761-764, 1995.
24. KNAPP, J. S.; NEWBY, P. S.; REECE, L. P. Decolorization of dyes by wood-rotting *Basidiomycete* fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.664-668, 1995.
25. KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. **Biosurfactants and Biotechnology**. Marcel Dekker Inc., 1987, 342 p.
26. KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.204, p.1-8, 1998.
27. KUNZ, A.; REGINATTO, V.; DURÁN, N. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. **Chemosphere**, v.44, p.281-287, 2001.
28. KUSHIDA, M. **Caracterização parcial e propriedades de biosurfactantes bacterianos**. Campinas, 2000. 78p. Tese (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

29. MAC FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2. ed. Williams & Wilkins, 1980, 527 p.
30. MARMION, D. M. **Handbook of U. S. colorants: foods, drugs, cosmetics and medical devices**. 3. ed. Wiley Interscience, 1991, 573 p.
31. MARTINS, M. A. M.; FERREIRA, I. C.; SANTOS, I. M.; QUEIROZ, M. J.; LIMA, N. Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of biotechnology**, v.89, p.91-98, 2001.
32. MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 211-218, 2000.
33. NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; CABANILLAS, C. G.; LLERENA, M. J. V.; SALCEDO, A. C. Resolution of ternary mixtures of tartrazine, sunset yellow and ponceau 4R by derivative spectrophotometric ratio spectrum-zero crossing method in commercial foods. **Talanta**, v. 46, p. 933-942, 1998.
34. NEVADO, J. J. B.; FLORES, J. R.; LLERENA, M. J. V.; FARÍÑAS, N. R. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, patent blue V and indigo carmine in commercial products by partial

least squares and principal component regression methods. **Talanta**, v. 48, p. 895-903, 1999.

35. NEVES, E. B. **Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por bactérias**. Campinas, 2000. 200 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
36. PASTI-GRISBY, M. B.; PASZCZYNSKY, A; GOSZCZYNSKY, S.; CRAWFORD, D. L.; CRAWFORD, R. L. Influence of aromatic patterns on azo dye degradability by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 3605-3613, 1992.
37. RAZO-FLORES, E.; DONLON, B.; LETTINGA, G.; FIELD, J. A. Biotransformation and biodegradation of *N*-substituted aromatics methanogenic granular sludge. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p.525-538, 1997.
38. RAZO-FLORES, E.; LUIJTEN, M.; DONLON, B.; LETTINGA, G.; FIELD, J. Biodegradation of selected azo dyes under methanogenic conditions. **Water Science Techonology**, v. 36, p.65-72, 1997.
39. ROTH, P.; SATTLER, K.; BERGER, R.; VINZ, M. Hydrophobicity and microbial activities discoloring, detoxification and degradation of triphenylmethane dyes. **Zbl Mikrobiology**, v. 147, p.409-417, 1992.

40. SANI, R. K.; AZMI, W.; BANERJEE, U. C. Comparison of static and shake culture in the decolorization of textile dyes and dye effluents by *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 85-88, 1998.
41. SAYAR, S.; ÖZDEMİR, Y. First-derivative spectrophotometric determination of ponceau 4R, sunset yellow and tartrazine in confectionery products. **Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 367-372, 1998.
42. SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies**. Tradução Juergen Heinrich Maar. Edgard Blücher, 1975. 179p.
43. TORREZ-MARTÍNEZ, C. L.; KHO, R.; MIAN, O. I.; MEHRA, R. K. Efficient photocatalytic degradation of environmental pollutants with mass-produced ZnS nanocrystals. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.240, p.525-532 (2001).
44. VAUTIER, M.; GUILLARD, C.; HERRMANN, J. Photocatalytic degradation of dyes in water: case study of indigo and of indigo carmine. **Journal of Catalysis**, v.201, p.46-59, 2001.
45. YATOME, C.; OGAWA, T.; MATSUI, M. Degradation of crystal violet by *Bacillus subtilis*. **Journal of Environmental Science Health**, v. A 26, p.75-87, 1991.

46. YOSHIDA, Y.; OGATA, S.; NAKAMATSU, S.; SHIMAMUNE, T.; KIKAWA, K.; INOUE, H.; IWAKURA, C. Decoloration of azo dye using atomic hydrogen permeating through a Pt-modified palladized Pd sheet electrode. **Electrochimica Acta**, v. 45, p. 409-414, 1999.
47. WONG, P. K.; YUEN, P. Y. Decolourization and biodegradation of N,N'-dimethyl-*p*-phenylenediamine by *Klebsiella pneumoniae* RS-13 and *Acetobacter liquefaciens* S-1. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p. 79-87, 1998.
48. ZAJIC, J. E.; SMITH, S. W. **Biosurfactants and biotechnology: oil separation relating to hydrophobicity and microbes**. Marcel Dekker Inc., 1987, 342 p.
49. ZISSI, U.; LYBERATOS, G. Azo-dye biodegradation under anoxic conditions. **Water Science Technology**, v.34, p.495-500, 1996.

APÊNDICES

Apêndice 1: Atividades de emulsificação, frente ao tolueno, em meios de cultura contendo os corantes artificiais *amaranto*, *new coccine*, *orange G*, *tartrazina* ou *erio Glaucine*, incubados a 55°C, por 10 dias.

LINHAGENS	CORANTES											
	<i>Amaranto</i>			<i>New Coccine</i>			<i>Orange G</i>			<i>Tartrazina</i>		
	Abs.	Halo		Abs.	Halo		Abs.	Halo		Abs.	Halo	
		cm	bolhas		cm	bolhas		cm	bolhas		cm	bolhas
B3G	0,02	2,5	+3	0,04	2,4	+3	0,04	2,4	+3	0,08	0,3	+2
AO 30	0,09	1,8	+2	0,01	2,0	+3	0,09	1,8	+2	0,01	2,0	+3
A 30	0,04	1,9	+2	0,01	2,1	+3	0,08	1,7	+1	0,04	2,3	+3
<i>Bacillus cereus</i>	0,06	1,2	+1	0,05	1,1	+1	0,04	0,4	+2	0,02	1,2	+2
<i>Planococcus citreus</i>	0,01	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0	0,04	0,0	0,0
7 I	0,16	0,0	0,0	0,12	1,0	+2	0,14	0,0	0,0	0,07	0,0	0,0
C 50	0,19	2,5	+4	0,13	2,6	+4	0,15	2,5	+4	0,20	2,6	+4
A 50	0,31	2,4	+4	0,40	2,6	+4	0,37	2,5	+4	0,52	2,7	+4
Controle	0,00	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0

Apêndice 2: Atividades de emulsificação, frente ao xileno, em meios de cultura contendo os corantes artificiais *amaranto*, *new coccine*, *orange G*, *tartrazina* ou *eriotglaucine*, incubados a 55°C, por 10 dias.

LINHAGENS	CORANTES											
	Amaranto			New Coccine			Orange G			Tartrazina		
	Abs.	Halo		Abs.	Halo		Abs.	Halo		Abs.	Halo	
		cm	bolhas		cm	bolhas		cm	bolhas		cm	bolhas
B3G	0,05	2,5	+3	0,06	2,6	+3	0,11	2,6	+3	0,02	0,3	+2
AO 30	0,04	2,2	+2	0,03	2,1	+3	0,02	2,1	+3	0,01	2,3	+3
A 30	0,15	2,2	+2	0,01	2,1	+3	0,01	1,9	+2	0,02	2,5	+3
<i>Bacillus cereus</i>	0,06	1,4	+1	0,05	0,8	+1	0,04	0,7	+2	0,05	1,8	+2
<i>Planococcus citreus</i>	0,01	0,0	0,0	0,02	0,0	0,0	0,01	0,0	0,0	0,03	0,0	0,0
7 I	0,13	0,0	0,0	0,07	1,7	+1	0,14	0,0	0,0	0,04	1,4	+1
C 50	0,18	2,7	+4	0,08	2,6	+4	0,16	2,7	+4	0,05	2,7	+4
A 50	0,27	2,7	+4	0,35	2,6	+4	0,37	2,6	+4	0,28	2,6	+4
Controle	0,00	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0

Apêndice 3: Variação do pH durante o crescimento das linhagens A 50 e C 50 em meio de cultura, contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

Dias	pH									
	<i>Amaranto</i>		<i>New Coccine</i>		<i>Orange G</i>		<i>Tartrazina</i>		<i>Erioglaucine</i>	
	A 50	C 50	A 50	C 50	A 50	C 50	A 50	C 50	A 50	C 50
1	6,8	6,9	7,1	7	7,1	7	6,9	6,8	6,9	6,7
2	7	7,1	7,2	6,8	7,2	7	7,1	7	6,8	6,7
3	6,9	7,1	7,2	6,6	7,2	7	7,1	6,9	6,7	6,6
4	7,1	7,2	7,3	6,6	7,1	6,8	7,2	7	6,9	6,7
5	7,2	7,1	7,1	6,7	7,1	7	7,3	7	7	6,8
6	7,2	7,1	6,9	6,8	6,9	6,8	7,2	7,1	7,2	6,9
7	7,1	7,2	6,8	6,8	6,9	6,7	7,1	7	7,1	7
8	7	7,1	6,9	6,7	6,7	6,9	7,2	6,9	7,2	6,9
9	6,9	7	7	6,9	6,8	6,7	7,2	6,9	7,1	7
10	7	7	7,1	6,9	6,9	6,9	7,1	6,9	7,1	7

Apêndice 4: Variação da massa seca durante o crescimento da linhagem A 50 em meio de cultura, contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

Dias	Massa Seca (g)				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	0,0123	0,0124	0,013	0,0127	0,0127
2	0,0167	0,0161	0,0185	0,015	0,0176
3	0,0207	0,0179	0,0197	0,0156	0,019
4	0,0213	0,0188	0,016	0,0143	0,0182
5	0,0184	0,0172	0,0155	0,0143	0,0179
6	0,0156	0,0153	0,0146	0,0136	0,0164
7	0,0147	0,0148	0,0131	0,0133	0,014
8	0,0137	0,0131	0,0126	0,0129	0,0134
9	0,0114	0,0109	0,0107	0,011	0,0115
10	0,0087	0,0104	0,0099	0,0101	0,0107

Apêndice 5: Variação da massa seca durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura, contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis.

Dias	Massa Seca (g)				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	0,0124	0,0171	0,017	0,0133	0,0183
2	0,0159	0,0174	0,0186	0,0141	0,0222
3	0,0202	0,0184	0,0213	0,0153	0,0238
4	0,0202	0,0179	0,0193	0,0154	0,0229
5	0,0185	0,0166	0,0175	0,016	0,0227
6	0,0179	0,0154	0,0164	0,0156	0,0219
7	0,0156	0,0131	0,0135	0,0135	0,0216
8	0,0143	0,0118	0,0118	0,0124	0,0206
9	0,0128	0,011	0,0103	0,0109	0,0147
10	0,0109	0,0095	0,0097	0,0098	0,0119

Apêndice 6: Atividade de emulsificação frente ao tolueno (absorbância) durante o crescimento da linhagem A 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Absorbância				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	0,27	0,32	0,34	0,40	0,18
2	0,30	0,40	0,35	0,46	0,28
3	0,32	0,41	0,37	0,51	0,28
4	0,31	0,39	0,35	0,49	0,29
5	0,35	0,38	0,35	0,50	0,28
6	0,27	0,38	0,34	0,50	0,29
7	0,32	0,40	0,36	0,51	0,28
8	0,32	0,41	0,35	0,53	0,28
9	0,33	0,39	0,36	0,52	0,29
10	0,31	0,38	0,36	0,53	0,28

Apêndice 7: Atividade de emulsificação frente ao tolueno (absorbância) durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Absorbância				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	0,10	0,09	0,07	0,11	0,17
2	0,17	0,15	0,13	0,17	0,26
3	0,19	0,14	0,15	0,20	0,26
4	0,18	0,13	0,15	0,23	0,25
5	0,16	0,15	0,14	0,21	0,27
6	0,20	0,14	0,13	0,22	0,26
7	0,21	0,13	0,15	0,20	0,26
8	0,18	0,14	0,13	0,21	0,26
9	0,18	0,14	0,13	0,23	0,27
10	0,21	0,14	0,15	0,21	0,25

Apêndice 8: Atividade de emulsificação frente ao xileno (absorbância) durante o crescimento da linhagem A 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Absorbância				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	0,18	0,26	0,31	0,20	0,04
2	0,27	0,32	0,36	0,25	0,07
3	0,26	0,30	0,36	0,29	0,06
4	0,25	0,34	0,34	0,28	0,09
5	0,26	0,31	0,39	0,29	0,07
6	0,27	0,31	0,37	0,26	0,09
7	0,25	0,30	0,38	0,27	0,09
8	0,25	0,32	0,36	0,28	0,09
9	0,24	0,33	0,37	0,26	0,09
10	0,25	0,32	0,35	0,26	0,09

Apêndice 9: Atividade de emulsificação frente ao xileno (absorbância) durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Absorbância				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	0,09	0,02	0,11	0,01	0,35
2	0,16	0,08	0,16	0,04	0,42
3	0,18	0,08	0,18	0,05	0,42
4	0,20	0,06	0,15	0,03	0,45
5	0,17	0,09	0,18	0,05	0,41
6	0,20	0,08	0,16	0,06	0,44
7	0,21	0,05	0,19	0,05	0,40
8	0,19	0,08	0,16	0,05	0,42
9	0,20	0,07	0,18	0,04	0,41
10	0,20	0,08	0,17	0,04	0,43

Apêndice 10: Atividade de emulsificação frente ao tolueno (altura de halos) durante o crescimento da linhagem A 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Altura de Halos				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	1,9	1,7	1,9	1,8	1,9
2	2,2	2,1	2,3	2,3	2,3
3	2,3	2,5	2,2	2,5	2,4
4	2,3	2,4	2,4	2,6	2,2
5	2,4	2,2	2,3	2,4	2,5
6	2,3	2,3	2,3	2,3	2,1
7	2,1	2,4	2,4	2,5	2,3
8	2,5	2,5	2,5	2,4	2,3
9	2,4	2,6	2,4	2,6	2,3
10	2,3	2,4	2,5	2,6	2,4

Apêndice 11: Atividade de emulsificação frente ao tolueno (altura de halos) durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Altura de Halos				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	1,8	2,0	1,9	1,9	1,7
2	2,3	2,4	2,2	2,4	2,3
3	2,1	2,5	2,4	2,6	2,2
4	2,4	2,3	2,2	2,3	2,3
5	2,2	2,5	2,3	2,5	2,1
6	2,5	2,6	2,5	2,6	2,4
7	2,4	2,4	2,3	2,4	2,2
8	2,3	2,3	2,2	2,3	2,3
9	2,5	2,5	2,3	2,4	2,2
10	2,5	2,4	2,4	2,5	2,4

Apêndice 12: Atividade de emulsificação frente ao xileno (altura de halos) durante o crescimento da linhagem A 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Altura de Halos				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	1,9	1,8	1,8	1,7	1,8
2	2,4	2,4	2,2	2,3	2,3
3	2,5	2,3	2,3	2,1	2,5
4	2,5	2,1	2,6	2,2	2,7
5	2,4	2,5	2,5	2,5	2,5
6	2,2	2,3	2,2	2,3	2,3
7	2,4	2,4	2,4	2,2	2,3
8	2,3	2,2	2,4	2,3	2,4
9	2,5	2,4	2,6	2,4	2,6
10	2,5	2,6	2,4	2,4	2,6

Apêndice 13: Atividade de emulsificação frente ao xileno (altura de halos) durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Altura de Halos				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	1,7	1,9	1,8	1,8	1,8
2	2,4	2,3	2,2	2,1	2,3
3	2,5	2,3	2,5	2,4	2,3
4	2,5	2,6	2,5	2,4	2,5
5	2,2	2,5	2,5	2,3	2,4
6	2,6	2,4	2,6	2,2	2,4
7	2,6	2,5	2,4	2,4	2,4
8	2,7	2,4	2,5	2,3	2,6
9	2,4	2,4	2,5	2,5	2,5
10	2,6	2,5	2,5	2,4	2,6

Apêndice 14: Atividade de emulsificação frente ao tolueno (compactação de bolhas) durante o crescimento da linhagem A 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Compactação de Bolhas				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	+3	+3	+3	+3	+3
2	+4	+4	+4	+4	+4
3	+4	+4	+4	+4	+4
4	+4	+4	+4	+4	+4
5	+4	+4	+4	+4	+4
6	+4	+4	+4	+4	+4
7	+4	+4	+4	+4	+4
8	+4	+4	+4	+4	+4
9	+4	+4	+4	+4	+4
10	+4	+4	+4	+4	+4

Apêndice 15: Atividade de emulsificação frente ao tolueno (compactação de bolhas) durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Compactação de Bolhas				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	+3	+4	+3	+3	+3
2	+4	+4	+4	+4	+4
3	+4	+4	+4	+4	+4
4	+4	+4	+4	+4	+4
5	+4	+4	+4	+4	+4
6	+4	+4	+4	+4	+4
7	+4	+4	+4	+4	+4
8	+4	+4	+4	+4	+4
9	+4	+4	+4	+4	+4
10	+4	+4	+4	+4	+4

Apêndice 16: Atividade de emulsificação frente ao xileno (compactação de bolhas) durante o crescimento da linhagem A 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Compactação de Bolhas				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	+3	+3	+3	+3	+3
2	+4	+4	+4	+4	+4
3	+4	+4	+4	+4	+4
4	+4	+4	+4	+4	+4
5	+4	+4	+4	+4	+4
6	+4	+4	+4	+4	+4
7	+4	+4	+4	+4	+4
8	+4	+4	+4	+4	+4
9	+4	+4	+4	+4	+4
10	+4	+4	+4	+4	+4

Apêndice 17: Atividade de emulsificação frente ao xileno (compactação de bolhas) durante o crescimento da linhagem C 50 em meio de cultura contendo cinco corantes.

Dias	Compactação de Bolhas				
	<i>Amaranto</i>	<i>New Coccine</i>	<i>Orange G</i>	<i>Tartrazina</i>	<i>Erioglaucine</i>
1	+3	+4	+3	+3	+3
2	+4	+4	+4	+4	+4
3	+4	+4	+4	+4	+4
4	+4	+4	+4	+4	+4
5	+4	+4	+4	+4	+4
6	+4	+4	+4	+4	+4
7	+4	+4	+4	+4	+4
8	+4	+4	+4	+4	+4
9	+4	+4	+4	+4	+4
10	+4	+4	+4	+4	+4

Apêndice 18: Valores médios obtidos, em espectrofotometria, para a razão entre as absorbâncias tomadas nos comprimentos de onda mínimo e máximo (Abs mín/Abs máx) apresentados por meio de cultura contendo cinco corantes, artificiais e hidrossolúveis, sob ação das cepas bacterianas A 50, C 50.

Dias de Incubação	Abs mín/Abs máx									
	Abs ₅₂₄ /Abs ₅₉₀		Abs ₅₀₆ /Abs ₅₇₀		Abs ₄₇₆ /Abs ₅₁₀		Abs ₄₃₀ /Abs ₄₈₀		Abs ₆₂₀ /Abs ₆₈₀	
	Amaranto		New Coccine		Orange G		Tartrazina		Erioglaucine	
	A50	C50	A50	C50	A50	C50	A50	C50	A50	C50
1	9,019	10,434	7,821	8,186	1,514	1,153	1,54	1,516	13,333	8,767
2	9,037	9,163	7,821	7,135	1,464	1,153	1,475	1,475	9,447	8,767
3	8,449	10,069	7,663	7,562	1,464	1,464	1,54	1,504	7,3	8,767
4	9,71	9,842	7,833	7,478	1,391	1,464	1,452	1,381	11,271	8,767
5	8,473	9,611	7,046	7,401	1,391	1,436	1,242	1,342	7,173	8,767
6	7,016	9,107	6,509	7,401	1,372	1,391	1,242	1,288	6,575	8,767
7	8,037	8,119	6,528	7,344	1,388	1,368	1,409	1,355	7,273	8,767
8	7,544	7,465	6,344	6,509	1,332	1,379	1,409	1,355	6,575	8
9	6,415	7,56	6,167	6,445	1,31	1,325	1,265	1,184	6,575	7,273
10	7,552	7,781	5,736	6,445	1,256	1,346	1,279	1,163	6,575	6,667