



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA**  
**COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

**PATRÍCIA CRISTINA DE VÉRAS SOUZA MAIA**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE  
ISOLADO DE *Bacillus subtilis* UCP 0146 POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM MANIPUEIRA**

**Recife  
2017**

**PATRÍCIA CRISTINA DE VÉRAS SOUZA MAIA**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE  
ISOLADO DE *Bacillus subtilis* UCP 0146 POR  
FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre **em Desenvolvimento de Processos Ambientais.**

**Área de Concentração:** Desenvolvimento em Processos Ambientais

**Linha de Pesquisa:** Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Galba Maria Campos Takaki

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Rosileide Fontenele da Silva Andrade

**Recife  
2017**

M111p

Ma, Patricia Cristina de Veras Souza

Produção e aplicação de bioemulsificante isolado de *Bacillus subtilis* UCP 0146 por fermentação submersa em manipueira / Patricia Cristina de Veras Souza Ma ; orientador Galba Maria Campos Takaki ; co-orientador Rosileide Fontenele da Silva Andrade, 2017.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2017.

1. Biotecnologia. 2. Bioemulsificante. 3. *Bacillus subtilis*. 4. Resíduos industriais. 5. Manipueira. I. Título.

CDU 574.6

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE ISOLADO DE  
*Bacillus subtilis* UCP 0146 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM  
MANIPUEIRA

PATRÍCIA CRISTINA DE VÉRAS SOUZA MAIA

Dissertação defendida em Recife, no dia 29 de junho de 2017 e aprovada pela  
Comissão Examinadora constituída pelos professores Doutores:



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki - Orientadora

Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clarissa Daisy Costa Albuquerque - (Membro interno)

Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana de Oliveira Franco – (Membro externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

RECIFE

2017

DEDICO à Deus por todos os desafios vencidos e graças alcançadas em todos os momentos da minha vida, à minha família que apesar dos momentos de ausência sempre compreenderam e apoiaram minha eterna inquietação pelo saber, a minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Rosileide Fontenele pelo carinho e incentivo em todos os momentos dessa jornada e a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Galba Takaki pelo exemplo de vida, amor à pesquisa e valiosos ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS e a minha família, por todos os desafios ultrapassados durante minha trajetória.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki, exemplo de sabedoria, pelo incentivo e dedicação à pesquisa, pela confiança em mim depositada.

A minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Rosileide Fontenele da Silva Andrade por transmitir tranquilidade, incentivo e pela sincera ajuda nos momentos difíceis dessa jornada.

Ao Reitor, Prof.<sup>o</sup>. Dr.<sup>o</sup>. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira S.J., pela oportunidade de utilização dos laboratórios do NPCIAMB e pelas facilidades na realização do Mestrado.

A Prof.<sup>a</sup>. Dra. Clarissa Daisy Costa Albuquerque, pelo respeito e ensinamentos. A todos os professores que fazem parte do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, e em especial ao Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Carlos Alberto Alves da Silva e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kaoru Okada, pela amizade, compreensão e estímulo.

A secretária Sônia Maria de Souza e aos técnicos de laboratório André Felipe Santos de Lima, e em especial, Severino Humberto de Almeida pela total disponibilidade e contribuição para a realização desse trabalho.

Aos colegas de turma pelo companheirismo, amizade, aprendizado e experiência na concretização desta jornada acadêmica.

A todos os colegas que integram o NPCIAMB pela compreensão, paciência e troca de conhecimentos e pelo constante incentivo. Muito obrigada, meus amigos.

À Capes pela bolsa concedida.

E ao CNPq, pelo fomento disponibilizado para execução da pesquisa.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I.....	10
1.1 INTRODUÇÃO .....	11
1.2 OBJETIVOS.....	13
1.2.1 Objetivo Geral.....	13
1.2.2 Objetivos Específicos .....	13
1.3.1 Compostos de superfície ativa.....	14
1.3.1.1 Surfactantes e Biossurfactantes .....	14
1.3.2 EMULSIFICANTES X BIOEMULSIFICANTES.....	15
1.3.2.1 Definições e caracterização dos emulsificantes.....	15
1.3.2.2 Estabilidade das emulsões .....	18
1.3.2.3 PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE .....	20
1.3.2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM NA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE .....	23
1.3.2.5 BIOEMULSIFICANTES PRODUZIDOS POR <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
1.3.2.4 FONTES RENOVÁVEIS À PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE .....	27
1.3.2.5 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO BIOEMULSIFICANTE.....	30
1.3.2.5.1 Aplicação nos processos ambientais.....	30
1.3.2.5.2 Aplicação nas indústrias de cosmético e terapêutica .....	31
1.3.2.5.3 Aplicação nas indústrias de petróleo .....	32
1.3.3.5.4 Aplicação na indústria de alimentos .....	33
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
CAPÍTULO II.....	41
Resumo.....	43

1. Introdução .....	44
2. Materiais e Métodos.....	46
3 Resultados e Discussão .....	51
Considerações Finais .....	61
Referências.....	62



# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

Figura 1. Característica anfifílica do emulsificante .....	17
Figura 2. Fases da emulsão.....	17
Figura 3. Atividade do emulsificante iônico óleo em água (A) e atividade do emulsificante não-iônico água em óleo (B). .....	17
Figura 4. Esquema dos possíveis mecanismos de desestabilização da emulsão .....	19

## CAPÍTULO II

Figura 1. Diagrama de Pareto para determinação da influência do inóculo, temperatura e agitação na produção de bioemulsificante de <i>Bacillus subtilis</i> .....	54
Figura 2. Características microscópicas das gotas formadas a partir do bioemulsificante: (A) Líquido metabólico à 24h; (B) Líquido metabólico à 48h; (C) Líquido metabólico à 72h;(D) Líquido metabólico à 96h. ....	55
Figura 3. Estabilidade do bioemulsificante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 0146 em função do índice de emulsificação: (A) pH; (B) NaCl e (C) Temperatura .....	58
Figura 4. Decolorização de corante azul de metileno pelo bioemulsificante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> .....	60
Figura 5. Dispersão do óleo queimado de motor pelo bioemulsificante de <i>Bacillus subtilis</i> : (A) Dispersão pelo bioemulsificante e (B) Dispersão com detergente comercial.....	60

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Classificação, exemplos e produção mundial dos surfactantes/ bioemulsificantes.....	22
Tabela 2. Principais tipos de biosurfactantes e micro-organismos produtores.....	22
Tabela 3. Principais tipos de biosurfactantes produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> .....	26
Tabela 4. Classificação científica de <i>Bacillus subtilis</i> .....	26
Tabela 5. Perspectiva da área plantada, área colhida, produção e rendimento da lavoura em Pernambuco em 2017 .....	28
Tabela 6. Composição química básica da manipueira.....	30

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial.....	47
Tabela 2. Índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) para diferentes substratos hidrofóbicos pelo bioemulsificante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> em meio formulado com manipueira .....	52
Tabela 3. O índice de emulsificação $EI_{24}$ (%) e $EI_{150}$ dias (%) em diferentes substratos hidrofóbicos do bioemulsificante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> de acordo com o planejamento fatorial completo $2^3$ .....	53
Tabela 4. Características e propriedades do bioemulsificante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> em meio formulado com manipueira.....	56
Tabela 5. Estabilidade do bioemulsificante após exposição a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas avaliado pela determinação da viscosidade .....	59

## RESUMO

Os Biossurfactantes são compostos tensoativos produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que apresentam na molécula uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, com potencial de redução da tensão superficial da água e ou de emulsificar líquidos com duas fases, os que apresentam essa última característica são denominados de bioemulsificantes. Apresentam potenciais de aplicação em varias áreas industriais como: alimentícia, agrícola, farmacêutica e petroquímica, devido a suas características de biodegradabilidade, não toxicidade e possibilidade de produção a partir de substratos renováveis. Neste trabalho, estudos foram realizados com *Bacillus subtilis* UCP 0146, investigando a produção de bioemulsificante, empregando como substrato o efluente agroindustrial (manipueira). O cultivo foi realizado em frascos de Erlenmeyers de 250 ml contendo 75 mL (100%) do meio de produção (manipueira) de acordo com planejamento fatorial completo  $2^3$ , teve como variável independente o volume do inóculo, temperatura e agitação e como variável resposta o índice de emulsificação ( $IE_{24}$ ), com 5% de inóculo com concentração de  $10^8$  cel /mL, incubado a 30°C, sob agitação de 150 rpm por 72h. Foi avaliado o bioemulsificante produzido no líquido metabólico livre de células, a fins da dosagem índice de emulsificação ( $IE_{24}$ ). As características do bioemulsificante avaliadas foram tamanho das gotas de emulsão, estabilidade frente a variações de pH, concentração de NaCl e temperatura. Os resultados mostraram que o bioemulsificante apresentou índice de emulsificação de 95,2% para óleo queimado de motor na melhor condição do planejamento (inóculo 9% (v/v), 25°C e 100rpm), apresentando formação de emulsão estável em relação ao  $IE_{24}$  em todas as temperaturas testadas, mas a melhor resposta foi com a temperatura de 70°C (96.0%). Em relação ao pH, foi observado um  $IE_{24h}$  de 91,6% e em relação a salinidade apresentou 92.0%. No teste de dispersão do deslocamento obteve o valor de 85,38 cm<sup>2</sup>. Quanto ao potencial de adsorção do corante catiônico azul de metileno removeu 62,2% após 12h, como também a remoção de 94,4% do óleo queimado de motor impregnado em solo arenoso. O *Bacillus subtilis* apresentou habilidade de produzir bioemulsificante utilizando a conversão metabólica do resíduo agroindustrial, tornando o bioprocessos econômico e com grande potencial na aplicação biotecnológica.

**Palavras-Chave:** Bioemulsificante, *Bacillus subtilis*, manipueira, efluente agroindustrial.

## ABSTRACT

Biosurfactants are tensioactive compounds produced by bacteria, yeasts and filamentous fungi, which have come in the molecule a hydrophobic and other hydrophilic portion, with potential to reduce water surface tension and liquid emulsion with two phases, called Bioemulsifiers. The bioemulsifiers presented potential of application in several industrial areas such as: food, agricultural, pharmaceutical and petrochemical, their characteristics of biodegradability, non-toxic and possibility of production from renewable substrates. In this sense, studies carried out with *Bacillus subtilis* UCP 0146, investigating a bioemulsifier production, using as substrate the agroindustrial effluent (manipueira). Cultivation was carried out in Erlenmeyer flasks containing 75 mL (100%) of the production medium (manimetry) according to the 2<sup>3</sup> factorial scale, with 5% inoculum at a concentration of 10<sup>8</sup> cells / mL, incubated at 30°C under agitation of 150 rpm for 72h, being evaluated the bioemulsifier produced in the cell free metabolic liquid, the emulsification index (IE<sub>24</sub>). As the good, the size of the emulsion droplets, stability to pH, NaCl and temperature. The results showed that the emulsifier had a 95.2% emulsification index with the engine burned oil in the best planning condition, showing a stable emulsion formation at all temperatures and a better response at the temperature of 70°C (96.0%). Regarding pH was observed in assay 2, an (IE<sub>24</sub>) of 91.6% relative to salinity or assay 4 represented 92.0%. In addition, no dispersion test showed displacement of 85.3 cm of the oil and the discoloration of methylene blue in aqueous solution, obtained the result of 62.2% removal. The *Bacillus subtilis* demonstrated the ability to produce bioemulsifiers using a metabolic conversion of the agroindustrial residue, making the bioprocessing economical and great potential in the biotechnological application.

**Key Words:** Bioemulsifier, *Bacillus subtilis*, cassava flour wastewater, agroindustrial effluent.

# CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUÇÃO

Os bioemulsificantes são moléculas anfílicas que apresentam capacidade de formação de emulsões estáveis, além de elevado peso molecular e baixo poder de redução da tensão superficial (SOUZA, 2016; SATPUTE, 2017).

Vários micro-organismos são capazes de produzir extracelularmente bioemulsificantes, a partir do metabolismo, se necessário formando emulsões estáveis em água/óleo ou óleo/água, além de desemulsificar e solubilizar substâncias hidrofóbicas, anticalcitrantes e hidrocarbonetos (SOUZA, 2016; PUNNIYAKOTTI, 2017; SATPUTE, 2017).

A produção de emulsificantes naturais (bioemulsificantes) por via microbiana apresenta diversas vantagens em relação aos seus sintéticos, tais como: elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixa irritabilidade e biocompatibilidade (DIAZ DE RIENZO et al., 2016; ZHAO, 2016; BISWAS et al., 2017; PUNNIYAKOTTI, 2017).

Contudo, os estudos com a produção de novas biomoléculas, estão condicionados a fatores limitantes como o uso de substratos convencionais pelo elevado custo, não sendo ainda competitivos em relação aos emulsificantes sintéticos (UZOIGWE et al. 2015; PUNNIYAKOTTI, 2017; RADZUAN, 2017).

Os avanços científicos na era da globalização industrial têm direcionado cada vez mais, diversas indústrias para a biotecnologia, visando a obtenção de bioprodutos, considerando a ampla aplicação em diversos setores industriais como: alimentícia, agrícola, farmacêutica, química e petroquímica, gerando assim, crescentes demandas (SEKHON-RANDHAWA, 2014; UZOIGWE et al. 2015; PUNNIYAKOTTI, 2017).

Desta forma, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato permitem um baixo-custo no processo de produção, otimizando a purificação e o rendimento, tornando a produção menos onerosa e mais competitiva no mercado (RANDHAWA, 2014; SHARMA et al., 2016; JOY et al., 2017).

A utilização de substratos renováveis para produção de bioemulsificante é uma importante contribuição para a redução dos custos de produção em larga escala e no processo de comercialização. Além disso, o uso desses resíduos é uma fonte renovável que contribui com a minimização da poluição ambiental causada pelo descarte inadequado dos resíduos (COSMANN, 2017).

Assim, a preocupação mundial com questões econômicas e ambientais geraram em 2015 na União Europeia (EU), uma comissão que lançou bases para uma “Economia Circular”, apresentando como estratégia a prevenção na produção de resíduos e quando estes ocorrem pelo processo inerente da produção, que possam ser utilizados para formas bioeconômicas, ou seja, que o uso de resíduo seja valorizado pela transformação em um bioproduto de elevado valor agregado (SATPUTE, 2017).

Assim, a produção de bioemulsificante por *Bacillus subtilis*, é justificado como uma alternativa promissora, de baixo custo e com perspectivas de sustentabilidade pelo aproveitamento do resíduo industrial (manipueira), como fonte renovável, além de possibilitar o desenvolvimento científico e atendimento às demandas do mercado mundial.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial biotecnológico do *Bacillus subtilis* UCP 0146, para produção de bioemulsificante, empregando efluente manipueira como substrato.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a produção bioemulsificante por *B. subtilis* UCP 0146 empregando manipueira;
- Realizar um planejamento fatorial completo  $2^3$ , tendo como variáveis independentes o volume do inóculo, a temperatura de incubação e a agitação e como variável resposta o índice de emulsificação;
- Selecionar a melhor condição de produção do bioemulsificante por *B.subtilis*;
- Avaliar o crescimento do *B. subtilis* e a produção do bioemulsificante na condição selecionada do planejamento que apresentar melhor resultado;
- Avaliar a estabilidade do bioemulsificante frente à diferentes condições de temperaturas, pH e concentrações de salinidade;
- Aplicar a biomolécula.



## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1 Compostos de superfície ativa

#### 1.3.1.1 Surfactantes e Biosurfactantes

Os surfactantes são compostos químicos derivados do petróleo e estima-se que cerca de 10 milhões de toneladas por ano são produzidos. Entretanto, o interesse na preservação ambiental tem conduzido à utilização dos surfactantes de origem biológica por apresentarem elevada aceitabilidade ecológica e baixa toxicidade (MAKKAR, et al., 2012; PARTHIPAN, 2017). Dentre os surfactantes utilizados comercialmente destacam-se os ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônicos) (SHARMA, SAHARAN, 2014).

As características anfipáticas dos surfactantes ocorrem devido à presença de uma porção hidrofóbica (apolar hidrocarbonada) e outra hidrofílica (polar iônica, não-iônica ou anfotérica) na mesma molécula, possibilitando reduzir a tensão superficial e interfacial, além de proporcionar formação de emulsões estáveis. Estas características permitem produzir detergentes, emulsificantes e dispersantes, o que possibilita aplicação industrial (CORREA, 2015; SOUZA, 2016; PEREZ et al., 2017; SILVA, et al., 2017).

Os biosurfactantes são subprodutos naturais de origem microbiana (bactérias, fungos e leveduras) com propriedades, iguais ou superiores aos surfactantes sintéticos (NITSCHKE et al., 2007; PANJIAR, 2017). As vantagens dos biosurfactantes em relação aos surfactantes químicos são: elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica e possibilidade de serem produzidos com a utilização de matérias-primas renováveis e de baixo custo (NITSCHKE; PASTORE 2006; SANTOS, 2016).

Diferentemente dos surfactantes sintéticos, os biosurfactantes são naturais, podem ser produzidos por micro-organismos, plantas e animais. A classificação é baseada na sua estrutura química e pela espécie microbiana produtora e também pelo seu peso molecular, embora o potencial de produção seja determinado também pela genética dos micro-organismos e a natureza do substrato. O tipo de biosurfactante é muito específico podendo variar de espécie para espécie (LUNA et al., 2013; JANEK et al., 2012; SAHA, 2017).

As principais classes destes metabólitos secundários incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros fosfolipídeos e biossurfactantes poliméricos e particulados, sendo os lipopeptídeos os biossurfactantes mais efetivos (SINGH, 2012; AUDISIO, 2013). Dentre esses, os lipopeptídeos e glicopeptídeos são os biossurfactantes que possuem comprovada atividade antibiótica. Estudos indicam que o gênero *Bacillus* é um dos maiores produtores de biossurfactantes do tipo lipopeptídeo com elevado potencial biotecnológico (HERCULANO et al., 2011; RUFINO, 2011; RAY, 2017).

O *Bacillus subtilis* é relatado como responsável pela produção de lipopeptídeos surfactantes, sendo o mais conhecido a surfactina. Além disso, o gênero também produz lipopeptídeos com propriedades antimicrobianas: fengicina, iturina, bacillomicinas e micosubtilinas (DAS et al, 2008).

Estudos realizados confirmam a atividade antimicrobiana sobre 29 bactérias pelo uso de dois lipopeptídeos produzidos pelo *B. subtilis*. Lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* e por *B. licheniformis* foram testados contra micro-organismos patogênicos, sendo o produto de *B. subtilis* efetivo contra bactérias Gram-positivas e não contra as Gram-negativas; contudo ocorreu o inverso para o produto obtido de *B. licheniformis* (KORENBLUM, 2012; KAVYANIFARD, 2016).

A surfactina age diretamente em membranas contendo fosfolipídios que possuem cadeias mais curtas e/ou estão em organização fluída, conseqüentemente, interferindo com as funções biológicas por meio da inserção nas bicamadas lipídicas, modificando a permeabilidade da membrana, formando canais iônicos ou por carrear cátions mono ou bivalentes, solubilizando assim, a membrana por ação detergente (ARAUJO, 2012; NITSCHKE; SILVA, 2016).

## **1.3.2 EMULSIFICANTES X BIOEMULSIFICANTES**

### **1.3.2.1 Definições e caracterização dos emulsificantes**

Os agentes emulsificantes são moléculas que ao serem adicionadas às emulsões aumentam a sua estabilidade cinética tornando-as razoavelmente estáveis e homogêneas, sendo a emulsão um sistema coloidal disperso no qual as fases são líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis (OLIVEIRA et al., 2004; FRANGE; GARCIA, 2009; CAMPOS et al., 2013).

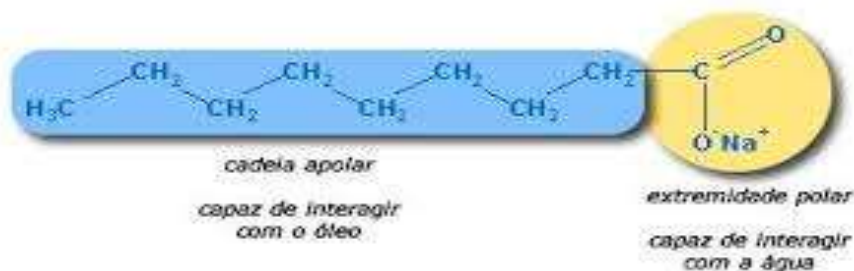
Em quase todas as emulsões uma das fases é água (fase contínua) e a outra é um líquido não miscível chamado de óleo (fase dispersa) e os glóbulos do líquido disperso apresentam, geralmente, diâmetros entre 0.1  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ . Se o óleo for a fase dispersa, a emulsão é chamada emulsão óleo em água (O/A); se o meio aquoso for a fase dispersa, é chamado de emulsão de água em óleo (AIO) (SHAW, 1975; KALE, 2017).

Por serem instáveis termodinamicamente as emulsões não se formam espontaneamente, sendo assim necessário fornecer energia para formá-las através de processos físico-químicos como: agitação e a utilização de substâncias homogenizadoras. A propriedade mais importante de uma emulsão é a sua estabilidade, sendo esta dependente de vários fatores como: diferença de densidade entre as fases, viscosidade do sistema, dimensões do dispersóide, relação entre os volumes das fases, existência e valor das cargas elétricas, presença de substâncias tensoativas e da tensão superficial (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; JANEK et al., 2012; UZOIGWE et al., 2015; SOUZA, 2016).

Os emulsificantes são substâncias anfipáticas, que apresentam em sua molécula uma porção apolar de natureza de hidrocarboneto, solúvel em óleo e uma extremidade polar solúvel em água (figura 1). Estas substâncias são capazes de se solubilizar tanto em água quanto em óleo. A sua solubilidade em óleo é conferida pela cadeia carbônica enquanto que o grupo polar, por sua afinidade com a água, é capaz de formar uma cadeia carbônica e produzir uma solução aquosa. Quando estas substâncias são colocadas em meio óleo-água ou água-ar elas se orientam de modo a manter os grupos hidrofílicos na fase aquosa e as cadeias carbônicas na fase oleosa, conforme a figura 2. Em função dessas características, os emulsificantes reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão (CIRIGLIANO & CARMAN, 1985; INÈS- DHOUHA, 2015; UZOIGWE, 2015; SHARMA et al., 2016).

Análises internacionais do mercado indicam que a Europa, a área Ásia-Pacífico e os Estados Unidos detêm a maior parte do mercado global de emulsificantes. Nos próximos anos, é a região Ásia-Pacífico que deverá apresentar a maior taxa de crescimento anual, com Compound Annual Growth Rate (CAGR), de 8,0%. Além da crescente demanda no setor de alimentos, bebidas e produtos para cuidados pessoais, os emulsificantes estão encontrando mercado também na forma de microemulsão no setor farmacêutico e na biorremediação. O mercado de emulsificantes é um exemplo claro de um mercado estável, com crescimento revivido através da implementação de inovações estratégicas e novas tecnologias (FOOD INGREDIENT BRASIL, 2013).

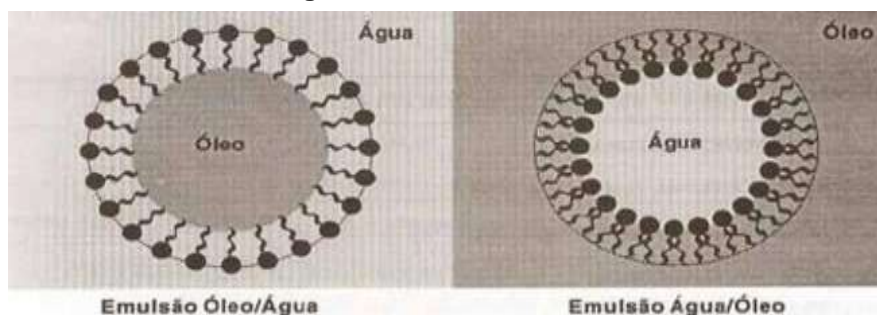
**Figura 1.** Característica anfifílica do emulsificante



Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013.

A classificação é baseada de acordo com a distribuição de suas fases. Conforme a figura 2.

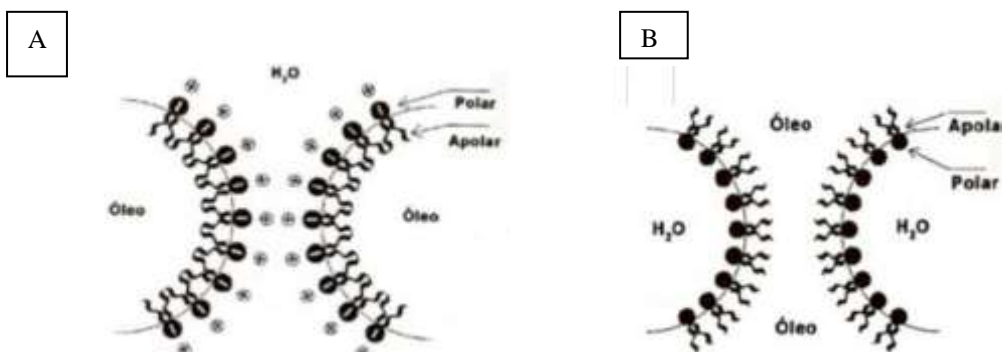
**Figura 2.** Fases da emulsão



Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013.

Também podem ser classificados pela carga, sendo os emulsificantes iônicos responsáveis por estabilizarem emulsões do tipo óleo/água (Figura 3 A). Na interface, o grupo alquílica interage com as gotículas de óleo, enquanto os grupos finais carregados se projetam para a fase aquosa. A participação de íons com carga opostas propicia a formação de uma camada dupla, essa previne a agregação das gotículas do óleo. Os não iônicos são orientados na superfície das gotículas do óleo com a porção polar projetada para a fase aquosa (Figura 3 B) (TADROS, 2013).

**Figura 3.** Atividade do emulsificante iônico óleo em água (A) e atividade do emulsificante não-iônico água em óleo (B).



Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013.

A estrutura das emulsões também é uma forma de classificar o sistema, segundo Tadros et al, (2013), de acordo com:

1. O/A (óleo/água) e A/O (água/óleo)/ macro-emulsões: normalmente possuem uma faixa de tamanho de 0,1 - 5µm, tendo como uma média de 1-2 µm.
2. Nano-emulsões: geralmente apresentam tamanhos variáveis de 20-100 nm. Também como as macro-emulsões, são apenas cineticamente estáveis.
3. Emulsões ou micro-emulsões micelares: estes geralmente possuem uma faixa de tamanho de 5-50 nm e são termodinamicamente estáveis.
4. Duplas e múltiplas emulsões: são emulsões-de-emulsões, A/O/A.
5. Emulsões mistas: sistema constituído por gotas de dispersantes diferentes que não se misturam de uma forma contínua.

### 1.3.2.2 Estabilidade das emulsões

A estabilidade de emulsões de substâncias não miscíveis entre si permitem a obtenção de produtos estáveis cuja homogeneização possibilitará o processo industrial. Quando ocorre a adição de um emulsificante a uma emulsão contendo água e óleo é formado na interface dos dois componentes um filme pelas moléculas do emulsificante orientadas de acordo com a sua polaridade. Esta nova condição irá reduzir a tensão interfacial entre os líquidos. Desta forma os líquidos imiscíveis poderão ser dispersos um no outro, através da agitação e formação de micelas.

Segundo Wong (1995) a estabilidade coloidal da emulsão considera que as partículas dispersas estão submetidas a ação de duas forças independentes, sendo estas:

**1- Atração de Van der Waals:** esta força atrativa se origina nas flutuações da densidade eletrônica em um átomo neutro. A distribuição desigual da densidade eletrônica cria momentaneamente um dipolo que pode induzir a formação de uma estrutura similar em um átomo vizinho.

O potencial atrativo entre as partículas é igual a soma de todas as forças sobre todos os átomos, aumenta com o tamanho das partículas e diminui com a distância entre elas.

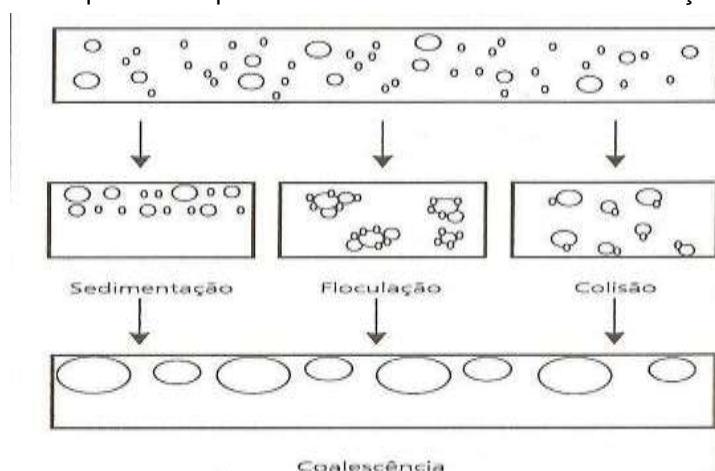
**2- Repulsão eletrostática:** uma partícula com uma superfície carregada uniformemente pode causar uma distribuição desigual dos íons da solução, formando uma dupla camada elétrica sobre sua superfície. Os íons com carga

oposta a da partícula se acumulam em torno da superfície, em uma concentração que decresce com a distância.

Os mecanismos que favorecem o processo de instabilidade das emulsões são de acordo com Ordóñez (2005), como demonstra a Figura 4:

- a) Separação das fases por sedimentação: As gotas dispersas têm densidade diferente da fase dispersante, e, por isso, pode haver sedimentação e separação das fases devido à força da gravidade. A velocidade com que se produz a emulsão é diretamente proporcional ao tamanho das gotas da fase dispersa e inversamente proporcional à viscosidade da fase contínua ou dispersante.
- b) Floculação das gotas devido a supressão das cargas elétricas, com a consequente inibição das repulsões eletrostáticas: As gotas se unem umas as outras, ficando separadas por uma camada finíssima da fase contínua. Mediante a floculação, aumenta-se o tamanho aparente das gotas e, portanto, a velocidade de sedimentação. Os glóbulos movem-se como um conjunto, em vez de individualmente. A floculação não implica na ruptura da película interfacial que envolve o glóbulo e, portanto, não se deve esperar mudança no tamanho dos glóbulos originais.
- c) Coalescência das gotas: Aumenta-se se tamanho real, podendo-se chegar à separação das duas fases em duas camadas por uma interface de superfície mínima. Implica, portanto, a ruptura da película interfacial.

**Figura 4.** Esquema dos possíveis mecanismos de desestabilização da emulsão



Fonte: ORDÓÑEZ, 2005.

Com o objetivo de diminuir o risco da desestabilização rápida das emulsões, é frequente a utilização de emulsificantes que possibilitam propiciar de forma significativa a vida útil das emulsões. Podemos citar como exemplos:

- a) Eletrólitos minerais, que proporcionam cargas eletrostáticas às gotas dispersas para elevar a repulsão.
- b) Moléculas tensoativas, como proteínas, que se orientam de tal forma que seus extremos hidrofóbicos e hidrofílicos se colocam nas superfícies da interface óleo/água, respectivamente. O acúmulo dessas moléculas na interface reduz a tensão superficial.
- c) Macromoléculas dissolvidas na fase contínua, aumentando a viscosidade dessa fase (polissacarídeos espessantes) ou se adsorvendo na interface (proteínas solúveis em água), formando uma barreira na fase da coalescência (ORDÓÑEZ, 2005).

### **1.3.2.3 Produção de bioemulsificante**

Os termos biossurfactantes e bioemulsificantes são referidos como biomoléculas tensoativas, porém os trabalhos recentes conseguiram identificar diferenças nas características físico-químicas dessas moléculas, passando assim a serem reconhecidas como compostos diferentes, os biossurfactantes são representados por compostos de baixo peso molecular, sendo classificados por lipopeptídeos, glicolípídeos e entre outros (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; SMYTH et al. 2010; FRANZETTI et al. 2012; PEREZ et al., 2017; SILVA, et al., 2017).

Os bioemulsificantes são capazes de estabilizar as emulsões, são moléculas de elevado peso molecular, como exopolissacarídeos, podendo ser misturas complexas de heteropolissacarídeos e lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas. Apresentam uma redução da tensão superficial menos pronunciada quando comparado ao biossurfactante, logo métodos como a medição de superfície e tensão interfacial, colapso de gota e testes de hemólise muitas vezes não são suficientes para a identificação e diferenciação entre o bioemulsificante do biossurfactantes, ocasionando assim o descarte de bioemulsificante por não apresentarem alterações significativas da tensão superficial, em relação ao biossurfactante (CIRIGLIANO & CARMAN, 1985; JAGTAP et al., 2010).

Desta forma, os métodos de índice e atividade de emulsificação são os mais indicados para avaliar capacidade de emulsificação de biomoléculas empregando substratos hidrofóbicos (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; UZOIGWE et al. 2015).

No bioemulsificante o processo de solubilização de substratos é elevado devido ao seu acesso e disponibilidade para a biodegradação, possibilitando à formação de emulsões estáveis, sendo considerada uma propriedade de grande interesse industrial (SEKHON-RANDHAWA, 2014).

A demanda industrial de emulsificantes vem sendo crescente no mercado de cosmético, alimento, farmacêutica e de petróleo, para atender a essas solicitações os emulsificantes sintéticos são usados gerando danos ao meio ambiente através da descarga de resíduos aquosos ou pela aplicação direta, causando toxicidade a microflora, peixes e bactérias em concentrações de 1 *mgn* (SMYTH et al. 2010; NITSCHKE, 2016).

Assim, a produção do bioemulsificante gerou o interesse industrial por apresentar características semelhantes aos sintéticos, no entanto com superioridade em relação à baixa toxicidade, biodegradabilidade, especificidade e um número elevado de estruturas, funcionalidade sob condições extremas de pH, salinidade e temperatura, estabilidade, entre outros (CHANDANKERE et al., 2013, SEKHNON-RANDHAWA,2014), conforme Tabela 1.

A utilização de hidrocarbonetos para a produção do bioemulsificante eleva o custo de produção por serem compostos não miscíveis com água, havendo a necessidade da utilização de equipamentos especiais e gerando um baixo rendimento. O primeiro bioemulsificante produzido comercialmente a partir de hidrocarbonetos foi o “Emulsan” pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012). O “emulsan” é um heteropolissacarídeo poliônico com peso molecular d  $9,8 \times 10^5$  D, os polissacarrídeos que o constituem são três amino-açúcares: D-galactosamina, ácido )-galactosamina urônico e um não identificado (SOEMO, 2013; GUDIÑA et al., 2015).

Outro bioemulsificante com alto peso molecular é o “alasan”, um complexo aniônico, composto por um polissacarídeo e uma proteína, isolado da bactéria *Acinetobacter radioresistens* (NAVON-VENEZIA et al., 1995). O gênero *Streptomyces* sp. produziu um bioemulsificante composto de: proteína (82%), açúcar (1%) e polissacarídeo (17%), que apresenta alta atividade emulsificante e atividade superficial (KOKARE et al., 2007), conforme a Tabela 2.



**Tabela 1.** Classificação, exemplos e produção mundial dos surfactantes/ bioemulsificantes.

Classificação	Exemplos	Produção Mundial (%)
Aniônicos	Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	~50
Catiônicos	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTBA)	~5-6
Não-iônicos	Polissorbato (Tween)	~40
Anfóteros	Betaínas (aminoácidos de cadeia longa)	~1

Fonte: SOEMO, 2013

**Tabela 2.** Principais tipos de biosurfactantes e micro-organismos produtores

Grupo	Subgrupo	Classe	Micro-organismo
Biosurfactantes Baixo peso molecular	Glicolipídeos	Rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
		Sophorolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp</i>
		Trehalolipídeo	
	Lipopeptídios e lipoproteínas	Cellobiolipídeos	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>U. maydis</i>
		Surfactina	<i>Bacillus subtilis P.</i>
		Viscosina	<i>fluorescens B. licheniformis</i>
Ácido-graxo, lipídio neutro e fosfolipídeos	Peptídio	<i>Corynebacterium lepus</i>	
	Ácidos graxos		
Bioemulsificante Alto peso molecular	Surfactantes poliméricos	Lipídios neutros	<i>C. lepus</i>
		Fosfolipídeos	<i>T. thiooxidans</i>
		Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
	Surfactantes Particulados	Alasan	<i>A. radioresistens</i>
		Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
		Vesículas e fímbrias Células inteiras	<i>A.calcoaceticus</i> Várias bactérias

Fonte: BENTO, CAMARGO, GAYLARDE (2008); SOURAV et al. (2015); UZOIGWE et al. (2015).

### 1.3.2.4 Fatores que influenciam na produção de bioemulsificante

Os parâmetros do meio de cultivo irão favorecer ou reprimir a síntese do bioemulsificante. O efeito sobre a produção está relacionado à fonte de carbono, nitrogênio, sais, concentração de NaCl, pH, temperatura, agitação, aeração e o próprio micro-organismo produtor (ROSETO et al., 2003; SYAHRIANSYAH; HAMZAH, 2016).

A fonte de carbono é considerada um dos fatores que mais influenciam na síntese, uma vez que pode promover o crescimento do micro-organismo. A produção de origem microbiana exige uma combinação de fontes de carbono hidrofílica (glicose, lactose, n-alcanos) e hidrofóbica (óleo de soja, óleo de milho, óleo de linhaça, azeite de oliva e seus efluentes obtidos da produção industrial) (SAJNA et al., 2013; RUFINO et al., 2014).

Makkar, Cameotra (2002) observaram a produção por *Bacillus subtilis* onde a glicose, a sacarose e o piruvato de sódio foram favoráveis na produção do bioproduto, enquanto o n-hexadecano favoreceu apenas o crescimento da cultura durante a fermentação.

Aparna et al. (2012) analisaram diferentes substratos de baixo custo, tais como melaço, glicerol, soro de leite e meio de fermentação composto sem fonte de carbono, cujo rendimento da produção de raminolipídeos (0,22 g/L) foi inferior se comparada às demais fontes.

Utilizando fontes de carbono hidrofóbico, Bhangale et al. (2014) relacionaram os diferentes ácidos graxos oriundos do óleo de mamona e glicerol com a estrutura do sofrorolipídeo produzido.

As fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio são consideradas o segundo fator que mais influência na produção de surfactantes biológicos. O extrato de levedura combinado aos sais de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e/ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  são as fontes mais utilizadas, pois as variações das suas concentrações influenciam diretamente na relação C/N (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012).

Essa razão é avaliada em muitos estudos, pois está diretamente relacionada ao metabolismo microbiano, geralmente a produção ocorre em concentrações limitantes de nitrogênio, na fase estacionária de crescimento do microrganismo (DECESARO et al., 2013).

Kiran et al., (2009) concluíram que a adição de 10% ( $\text{NaNO}_3$ ) e 25% de extrato de levedura produziu um pequeno aumento na produção de biotensioativo por *Aspergillus ustus*, sendo, portanto necessária apenas adição da fonte orgânica de nitrogênio ao meio.

Os parâmetros físico-químicos temperatura, agitação, aeração e pH são fatores que influenciam no rendimento da produção, assim como os fatores bioquímicos. A temperatura pode favorecer o decréscimo ou aumento da síntese, pois o aumento da biomassa favorece a liberação dos produtos metabólitos da célula microbiana (SAHOO et al., 2011).

O pH do meio influencia o crescimento celular e a síntese de metabólitos secundários. O rendimento da produção de lipopeptídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* foi estável sobre condições alcalinas e neutras (ZHAO et al., 2013). Khopade et al. (2012) otimizaram a produção do biossurfactante por *Nocardioopsis* sp. em pH 7,0 a temperatura de 30°C, reduzindo a tensão superficial para 30 mN/m. A produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu o aumento do rendimento entre a faixa de pH 7,0 - 7,15 (AL-ARAJI et al., 2007) e a temperatura ótima foi de 37°C (GEORGE; JAYACHANDRAN, 2013).

A agitação e a aeração possuem efeitos combinados, pois ambos facilitam a transferência de oxigênio no meio de fermentação (AQUARONE, 2001). Estes fatores também auxiliam a produção de biossurfactantes, pois possibilitam a solubilização de substratos insolúveis em água e conseqüentemente o transporte de nutrientes no meio de fermentação para o microrganismo (RAMKRISHNA et al., 2010). Willenbacher et al. (2015) observaram um acréscimo do rendimento durante a produção de surfactina aplicando o processo fermentativo anaeróbico para controlar a formação de espuma.

### **1.3.2.5 Bioemulsificantes produzidos por *Bacillus subtilis***

Os bioemulsificantes são surfactantes naturais, diferenciados pela natureza química da biomolécula e pela espécie microbiana produtora, enquanto os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar. Os surfactantes microbianos são moléculas complexas com grande diversidade de estruturas químicas (BENTO, CAMARGO, GAYLARDE, 2008), ainda para estes autores o tipo de biossurfactante, muitas vezes é específico do gênero, e às vezes da espécie.

Uma diversidade de micro-organismos, em sua maioria bactérias (*Pseudomonas* e *Bacillus*), leveduras (*Candida*) e, em menor quantidade, os fungos filamentosos são responsáveis pela produção dos bioemulsificantes (SAKTHIPRIYA et al., 2015; AL-WAHAIBI et al., 2014).

Estes micro-organismos vem sendo isolados de diversos ambientes, tais como: de terrestres (águas e solos) contaminados com derivados de petróleo (BENTO et al., 2005;

BATISTA et al., 2006; CHEN et al., 2012), marinhos, locais contaminados e não contaminados como águas e sedimentos (DHAIL; JASUJA, 2012; HASSANSHAHIAN et al., 2012a; 2012b; LIMA et al., 2017), com metais (VIJAYANAND; DIVYASHREE, 2015), também em locais sob condições extremas de temperatura (MALAVENDA et al., 2015; ELAZZAZY et al., 2015), pH (TAMBEKAR; DHUNDALE, 2012; TAMBEKAR et al., 2013), de alta pressão osmótica (BELGACEM et al., 2015), em ambientes salinos e hipersalinos (SARAFIN et al., 2014; COUTO et al., 2015), reservatórios de petróleo (TABATABAEE; ASSADI, 2005), e de órgãos de animais (JAGTAP et al., 2010; EBRAHIMI et al., 2012; SHARMA et al., 2016).

O interesse na identificação de micro-organismos capazes de produzir bioemulsificantes isolados de ambientes extremos é uma área de elevado interesse para aplicações industriais, uma vez que as adaptações específicas que estes metabólitos podem colaborem para sua estabilidade em habitantes adversos (COUTO et al., 2015; BELGACEM et al., 2015).

Muitos micro-organismos têm capacidade para produzir uma vasta gama de biossurfactantes, uma vez que a classificação inicial foi dividida em duas; baseada em peso molecular, propriedades e localizações celulares. Os biossurfactantes de baixo peso molecular, por exemplo, os glicolipídeos, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, diminuem as tensões superficial e interfacial nas interfaces ar/água, enquanto que os biossurfactantes de alto peso molecular são chamados de bioemulsificantes; os biossurfactantes poliméricos e particulados (tais como emulsan, alasan, lipossan, polissacáridos e complexos de proteínas) e são mais eficazes na estabilização de emulsões óleo-em-água (NEU, 1996, FRANZETTI et al., 2009).

Estes são bioemulsificantes eficientes que trabalham em baixas concentrações e não exigem uma considerável especificidade do substrato (DASTGHEIB et al., 2008).

Bactérias do gênero *Bacillus* são muito utilizadas para a produção industrial de proteínas recombinantes e biossurfactantes. Isso é devido ao fato de que a cultura dessas bactérias em sistema de produção em larga escala em densidades elevadas é de baixo custo e complexidade (WESTERS, 2004), conforme a Tabela 3.

**Tabela 3.** Principais tipos de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis*

Tipo de biossurfactante	Micro-organismo	Referências
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>	SUZUKI et al., 1965
Surfactina	<i>B. subtilis</i>	ARIMA et al., 1968
Subtilisina	<i>B. subtilis</i>	BERNHEIMER et al., 1970
Cerexina	<i>B. cereus</i>	SHOJI et al., 1975
Gramicidina	<i>B. brevis</i>	MARAHIEL et al., 1979
Liquenisina	<i>B. licheniformis</i>	JAVAHERI et al., 1985
Fengicina	<i>B. subtilis</i>	VANITTANAKOM., 1986
Surfactina	<i>B. pumilus</i>	MORIKAWA et al., 1992
Surfactina	<i>B. coagulans</i>	HUSZCZA et al., 2003
Ramnolípídeo	<i>B. subtilis</i>	CHRISTOVA et al., 2004
Surfactina	<i>B. atropheus</i>	NEVES et al., 2004
Bamilocina	<i>B. amyloliquefaciens</i>	LEE ET AL., 2007
Lipopeptídeo	<i>B. circulans</i>	DAS et al., 2008
Glicolípídeo	<i>B. megaterium</i>	THAVASI et al., 2008

**Fonte:** WESTERS, 2004.

Considerada como uma das principais espécies de micro-organismo para produção de biossurfactantes, *Bacillus subtilis* foi, por muito tempo, considerada uma bactéria estritamente aeróbia, porém, estudos conduzidos nos últimos anos, mostraram que tal espécie pode também crescer em ambientes anaeróbicos (ANDRADE, 2011).

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria sapróbia, gram positiva, proveniente do solo e formadora de esporos (MELLONI et al., 1982). Apresenta o crescimento de forma individual ou em pequenas cadeias. Sua classificação é demonstrada na Tabela 4. Possui mobilidade através do flagelo peritriquiado, é aeróbio facultativo e possui alta taxa de crescimento. Diferente de outras espécies desenvolve-se em amplas variações de temperatura (15 a 70°C) e pH (2 a 9.3), reduz os nitratos e absorve o amido (KONEMAN & ALLEN, 2008; BUITRAGO et al., 2011). A temperatura mais favorável ao crescimento é entre 28°C e 35°C e valores de atividade de água entre 0.93 a 0.95.

**Tabela 4.** Classificação científica de *Bacillus subtilis*

Reino	Bactéria
Filo	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordem	<i>Bacillales</i>
Família	<i>Bacillaceae</i>
Gênero	<i>Bacillus</i>
Espécie	<i>B. subtilis</i>

**Fonte:** MELLONI, 1982.

Conhecida como produtora de lipopeptídeos, a espécie *Bacillus subtilis*, ganhou destaque pela sua facilidade na produção de surfactina, melhor lipopeptídeo caracterizado (KUSHIDA, 2000). Quando comparada à surfactantes sintéticos como o *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) e o brometo de trimetil amônio (BTA) e até mesmo com outros biosurfactantes, a surfactina apresentou maior capacidade de redução da tensão superficial e interfacial, além de possuir valores de concentração micelar crítica (CMC) inferiores. Além disso, a surfactina é capaz de formar emulsões estáveis de óleos comestíveis em água garantindo uma maior aplicabilidade industrial (BARROS et al., 2007).

#### **1.3.2.4 Fontes renováveis à produção de bioemulsificante**

Muitos micro-organismos são capazes de utilizar diferentes substratos como fonte nutricional, sendo extenso os substratos utilizados para produção de bioemulsificantes, podemos destacar os hidrocarbonetos de petróleo (MAHJOURI et al., 2013), óleo vegetal residual (RUFINO et al., 2014), resíduos agroindustriais (CASTIGLIONI et al., 2009; FONTES et al., 2012), carboidratos (VIRAMONTES-RAMOS et al., 2010), dentre outros. A produção de bioemulsificantes a partir de substratos renováveis que apresentem uma composição nutricional adequada na bioconversão de produtos úteis, conforme a necessidade de aplicação pretendida pelas várias indústrias vem promovendo um interesse considerável nos últimos anos (MORAIS; ABUD, 2011; MARTI et al., 2015).

É frequente que os hidrocarbonetos induzam a síntese de bioemulsificante, porém a presença deste substrato não é um pré-requisito para todos os micro-organismos. Estes podem crescer e produzir o bioproduto tanto em meio contendo substratos insolúveis quanto solúveis e dependendo do substrato utilizado podemos observar alterações estruturais (SHARMA et al., 2016).

Como estratégia para viabilizar a produção de metabólitos microbianos utiliza-se substratos alternativos. A utilização do resíduo minimiza os custos relacionados à produção como também permite a valorização econômica de sua co-utilização, e conseqüentemente o tratamento e os impactos ao meio ambiente, assim, o sucesso para uma produção econômica ocorre pelo equilíbrio do desperdício permitindo o acúmulo do produto. Além de considerar o potencial enzimático de vários micro-organismos de sintetizar biomoléculas em diversos substratos imiscíveis em água, como os recursos renováveis de efluentes da produção agrícola, óleos vegetais e resíduos de destilarias e laticínios, entre outros (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MORAIS; ABUD, 2011).

Neste contexto, a mandioca é uma raiz com alto teor de amido cultivada na América tropical anterior ao processo de colonização. A espécie (*Manihot esculenta Crantz*) é originária do Brasil, região amazônica com fronteira com a Venezuela e se constitui em alimento energético amplamente consumido no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, o cultivo frequentemente é realizado por pequenos agricultores, em áreas e produtividade reduzidas (CANGNON, 2002; TIRONE et al., 2017).

Em relação a área cultivada, ocupa o 7º lugar no mundo e o 4º nos trópicos. Na América do Sul, além do Brasil, o Paraguai, Colômbia, Peru e Bolívia representam quase 90% da produção latino americana (FERREIRA, 2015; SEAB-PR, 2015).

A produção de mandioca em Pernambuco é basicamente direcionada ao consumo humano, na forma de farináceos, sendo insignificante a produção de fécula de mandioca para uso da indústria no estado. Apesar de a produção ser centralizada em pequenas propriedades, o baixo uso de tecnologia, permite uma lavoura de subsistência, porém, pelo potencial da cultura, essas áreas poderiam ser melhores aproveitadas, para obter maior produtividade da lavoura (IBGE, 2016).

No que se refere ao Estado de Pernambuco, seguem os dados obtidos de 2016 e a expectativa para 2017 a partir de levantamento realizado pelo IBGE, conforme Tabela 5.

**Tabela 5.** Perspectiva da área plantada, área colhida, produção e rendimento da lavoura em Pernambuco em 2017

Área plantada (ha)	0.968
Área colhida (ha)	43.914
Produção (ton)	398.408
Rendimento médio (ton/ha)	9,072

**Fonte:** IBGE/LSPA (2016)

Segundo Gaspar (2014), a matéria prima para se fabricar a farinha de mandioca, é uma planta da Família Eufrobicea, um tubérculo, conhecido popularmente na região como macaxeira ou mandioca, sempre cultivada é utilizado na alimentação da população pernambucana, ocorrendo no estado a existiam vários tipos de mandioca, como: branquinha, cruvela, caravela ou mamão, engana-ladrão, fria ou da mata, landim, manipeba, vermelha, entre outras.

Um das características da mandioca é a presença de um glicosídeo potencialmente hidrolisável liberando cianeto (HCN). A hidrólise não é evidente e só se realiza quando

ocorre a trituração ou prensa do tubérculo, liberando uma enzima da própria planta res. Caso a hidrólise não ocorra, o glicosídeo, tecnicamente denominado de linamarina, é estável e não promove risco à saúde e ao meio ambiente (CANGNON et al., 2002).

A liberação de HCN ocorre em uma velocidade significativa somente após o tecido da planta a ser dilacerado (prensa ou trituração) e o glicosídeo cianogênico entrar em contato com enzimas catabólicas. Em relação ao glicosídeo linamarina, a primeira etapa é catalisada por um  $\beta$ -glicosidase denominada linamarase. A clivagem produz glicose e acetacianoidrina que se dissocia espontaneamente em pH maiores que 5,0 ou por ação da hidroxinitrila liase (HNL), formando HCN e acetona. No caso da mandioca, a linamarase e HNL estão localizadas nas paredes celulares das folhas e a linamarina e lotasustralina encontram-se compartimentalizadas em vacúolos (CANGNON et al., 2002).

A manipueira é um efluente, com elevado potencial de agressão ao meio ambiente. A origem do termo vem do vocábulo indígena que foi incorporado a língua portuguesa e significa o suco ou água de constituição das raízes, de aspecto leitoso, de cor amarelo-clara que é extraída das raízes da mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), em decorrência da prensagem das raízes frescas, picadas ou massa ralada da indústria da farinha. Frequentemente desprezado sem nenhum aproveitamento econômico e com elevado riscos ambientais em decorrência do processo de armazenamento e descarte (CORDEIRO, 2006).

A produção desse efluente representa em torno de 267 a 419 litros por cada tonelada de raiz prensada. Esse volume é elevado quando se considera o total gerado no processamento em farinhas e féculas, 80% das 26,6 milhões de toneladas produzidas no Brasil (ROSSMANN, 2008).

A composição química da manipueira é basicamente constituída por carboidrato, nitrogênio e diversos sais minerais possibilitando assim o aproveitamento como meio para o cultivo de micro-organismos (CORDEIRO, 2006; NITSCHKE, PASTORE, 2006). A tabela 6 apresenta a composição da manipueira em trabalhos apresentados.



**Tabela 6.** Composição química básica da manipueira

<b>Variáveis (mg-L)</b>	<b>Cereda (1994)</b>	<b>Fernandes (1995)</b>	<b>Barana (1996)</b>	<b>Barana (2000)</b>
Cianeto Total	444,00	206.83,00	140,00	112,20
Nitrogênio	4.900,00	2.000,00	3.000,00	1.242,00
Carbono	37.000,00	35.000,00	35.000,00	12.330,00
Fósforo	160,00	250,00	300,00	325,00
Potássio	1.863,00	2.810,00	3.800,00	1.972,00
Cálcio	227,00	200,00	400,00	838,00
Enxofre	195,00	78,00	200,00	60,00
Magnésio	405,00	290,00	600,00	326,00
Ferro	15,30	7,00	6,40	12,40
Zinco	4,00	3,00	5,00	32,50
Manganês	3,70	3,30	3,50	2,20

Fonte: MUTHUSAMY et. al.; 2008.

### 1.3.2.5 Potencial biotecnológico na aplicação do bioemulsificante

As propriedades funcionais que os biossurfactantes apresentam fazem com que sejam compostos atrativos para sua utilização em uma variedade de processos e operações industriais e ambientais (THAVASI et al., 2011; FRACCHIA et al., 2014; WAGHMODE et al., 2014).

#### 1.3.2.5.1 Aplicação nos processos ambientais

As propriedades dos bioemulsificantes de origem microbiana, como: emulsificação e demulsificação, capacidade de dispersar hidrocarbonetos, capacidade umectante, espumante e de detergência são aplicadas em processos de biorremediação em ambientes contaminados com compostos orgânicos e inorgânicos (SOUZA et al., 2014; IVSHINA et al., 2016). Outro fator importante é o fato dos bioemulsificantes serem ecologicamente compatíveis tornando-os biomoléculas com potencial para serem utilizados na remoção de agentes contaminantes em ambientes terrestres como também em aquáticos sem

colaborarem com riscos de contaminação secundária quando comparados aos bioemulsificantes sintéticos (LAI et al., 2009; SINGH & CAMEOTRA, 2013).

Os corantes, em sua maioria, são agressivos ao meio ambiente, pois a poluição dos corpos de água com estes compostos provocam, além da poluição visual, alterações nos ciclos biológicos afetando a vida aquática, principalmente, nos processos de fotossíntese (MEDEIROS, 2011). Segundo Carreira (2006), os corantes são produtos químicos normalmente aplicados em solução, os quais se fixam de alguma forma em um substrato. As principais características desejáveis nos corantes são: serem estáveis à luz, apresentarem uma distribuição uniforme, propiciarem um alto grau de fixação e resistirem ao processo de lavagem. Os corantes têxteis apresentam dois componentes-chaves: o grupo cromóforo, responsável pela cor, e o grupo funcional, que se liga às fibras do tecido. Existem centenas de corantes citados na literatura, e classificados por sua natureza química ou em termos de sua aplicação ao tipo de fibra (KUNZ et al., 2002).

Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (2009), a decomposição do azul de metileno pode gerar óxido de enxofre e óxido nítrico; além de causar efeitos toxicológicos em organismos aquáticos e na qualidade da água. Esses subprodutos são tóxicos à biota aquática, diminuem a quantidade de oxigênio dissolvido, e modificam as propriedades e características dos cursos d' água (OLIVEIRA, 2006). Por todas as características apresentadas, o azul de metileno torna-se um resíduo difícil de tratar e, sendo catiônico, tem alta reatividade.

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), as tecnologias convencionais, como por exemplo, os processos físico-químicos (adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fotoquímica) mostram-se com uma eficácia reduzida no tratamento desses poluentes. Devido a essa condição, o estudo de novas metodologias se torna de elevada importância. Em relação às diversas alternativas para o tratamento dos efluentes industriais, o tratamento biológico de degradação, especificamente, o processo aeróbio destaca-se por ser ambientalmente apropriado, pois possibilita uma completa mineralização do poluente orgânico com custo reduzido, apresentam elevada remoção de corantes solúveis (PANDEY et al., 2007).

### **1.3.2.5.2 Aplicação na indústria de cosmético e terapêutica**

A aplicação na formulação de produtos cosméticos foi reportada por Morita et al., (2013) como bom ingrediente na formulação de hidratantes para pele seca, para

tratamentos de reparação capilar, dentre outros benefícios a partir de biossurfactante MELs.

Para uso farmacêutico e cosmético *por Paenibacillus macerans* (LIANG et al., 2014), os soforolípídeo são utilizados comercialmente como umectantes e os ramnolípídeos são apontados como biocompatíveis e ideais para uso cosmético (IRFAN-MAQSOOD; SEDDIQ-SHAMS, 2014), assim como os lipopeptídeos (VARVARESOU; IAKOVOU, 2015).

Os bioemulsificantes e suas potenciais aplicações medicinais são interesse de estudo frequentemente, especialmente devido às propriedades bioativas (GHARAEI-FATHABAD, 2011; RUFINO et al., 2012; SAMBANTHAMOORTHY et al., 2014; MEENA; KANWAR, 2015).

### **1.3.2.5.3 Aplicação na indústria de petróleo**

Os bioemulsificantes apresentam um vasto potencial em relação a sua aplicabilidade, podendo ser empregado na recuperação aprimorada de petróleo, perfuração de petróleo bruto (VARJANI, 2017).

A aplicação no campo de biorremediação mostra-se ser uma das mais promissoras, diante dos resultados de estudos já realizados, devido a capacidade de formação e estabilidade de emulsões entre hidrocarbonetos e misturas de água, promovendo a disponibilidade desses contaminantes no ambiente aquático para os micro-organismos que metabolizam esses compostos hidrofóbicos, além disso, são eficientes pelo método de lavagem na remoção de hidrocarbonetos em solos e sedimentos contaminados (FRANZETTI et al., 2012, SOUZA et al., 2012; MONTAGNOLLI, 2015; INÈS, SAHNOUN, GHRIBI. 2017).

Estudos demonstram respostas eficazes também na área da biorremediação de contaminação por metais pesados, que tendem a ser fortemente absorvido na matriz de solos e sedimentos, limitando sua solubilidade e dificulta a sua remoção posterior. Logo, o método de lavagem com bioemulsificante aumenta a dessorção de metais em solos e sedimentos, tornando esses compostos e outros poluentes para a captação microbiana, que são degradados em produtos inócuos (COLIN et al. 2013).

Os altos custos das etapas de *downstream* dificultam a competição dos bioproduto em relação aos sintéticos. Assim, a aplicação do bioemulsificante na indústria petroquímica e ambiental permite a obtenção de um produto bruto, sem a necessidade de outras etapas de purificação. Fato não observado na indústria de alimentos, farmacêutica e de

cosméticos que necessitam de um bioemulsificante com maior grau de pureza (BARCELOS et al., 2014; RAHMAN, 2015).

#### **1.3.3.5.4 Aplicação na indústria de alimentos**

Os bioemulsificantes apresentam múltiplas possibilidades de aplicação na indústria alimentícia especialmente como agentes emulsificantes, solubilizantes, umectantes (NITSCHKE; COSTA, 2007; RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014), como também no controle de crescimento, adesão e formação de biofilmes de patógenos microbianos (CAMPOS et al., 2013). A emulsificação tem elevada importância na consistência e textura dos alimentos, dispersão de fase e a solubilização de aromas (CAMPOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016). A função geral de um emulsificante é estabilizar a emulsão controlando a agregação de glóbulos de gorduras e estabilização de sistemas gaseificados (SANTOS et al., 2016). Apesar de sua principal aplicação estar correlacionada a formação e estabilização de emulsões, os bioemulsificantes também são utilizados para melhorar a textura e validade de produtos contendo amido, modificar as propriedades reológicas de massa para pão de trigo, melhorar a consistência e textura de produtos à base de gordura (FRACCHIA et al., 2012).

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v.6, p.191-199, 2003.

AGARWAL, P. K. Enzymes: an integrated view of structure, dynamics and function. **Microbial Cell Factories**, n.2, v.5, p.1-12, 2006.

AGTAP, S. et al. Production of bioemulsifier by acinetobacter species isolated from healthy human skin. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 1, p. 70–76, 2010.

AL-WAHAIBI, Yahya et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and surfaces. B*, **Biointerfaces**, v. 114, p. 324–33, 2014.

ANDRADE SILVA, Nadielly R. et al. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.

AYED, Bem.; HANEN et al, Characterization and stability of biosurfactant produced by *Bacillus mojavensis* A21 and its application in enhancing solubility of hydrocarbon, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 7, p. 1007–1014, 2014.

BARCELOS, G. S et al. Spray drying as a strategy for biosurfactant recovery, concentration and storage, **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 49, 2014.

BATISTA, S. B. et al. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 6, p. 868–875, 2006

BELGACEM, Z. et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 6, p. 1370–1384, 2015.

BENTO, F. M. et al. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 249–255, 2005.

BISWAS, Bhabananda et al. Structural changes in smectite due to interaction with a biosurfactant-producing bacterium *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*. **Applied Clay Science**, v. 136, p. 51-57, 2017.

BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; DA SILVA, S. S. Recent Advances in Sustainable Production and Application of Biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. ahead of print, 2016.

CAMPOS, J. M. et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1097–1108, 2013.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Production of a bioemulsifier with potential application in the food industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3234–52, mar. 2015.

CHANDANKERE, R.; YAO J.; CHOI M. M. F.; MASAKORALA K.; CHAN Y. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. **Biochem Eng J.** v.74, p. 46-53, 2013.

CHEN, J. et al. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 4, p. 660–671, 2012.

CHOWDHURY, S.R., MANNA, S., SAHA, P., BASAK, R.K., SEN, R., ROY, D., ADHIKARI, B. Composition analysis and material characterization of an emulsifying extracellular polysaccharide (EPS) produced by *Bacillus megaterium* RB-05: a hydrodynamic sedimentattached isolate of freshwater origin. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1381–1393, 2011.

CIRIGLIANO, MICHAEL C.; CARMAN, GEORGE M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

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

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 4–10, 1979.

COSMANN, Natassia Jersak et al. Use of biosurfactant surfactin produced from cassava wastewater for anaerobic treatment of effluent from a poultry slaughterhouse. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 224-231, 2017.

DE RIENZO, MA Diaz et al. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5773-5779, 2016.

DHAIL, S.; JASUJA, N. D. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 6, n. 6, p. 263–266, 2012.

DHASAYAN, A.; SELVIN, J.; KIRAN, S. Biosurfactant production from marine bacteria associated with sponge *Callyspongia diffusa*. **3 Biotech**, p. 443–454, 2014.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem**, 28, 350–356, 1956. FRANGE, R. C. C. ;; GARCIA, M. T. . Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva / água : avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263–271, 2009.

ELAZZAZY, A. M.; ABDELMONEIM, T. S.; ALMAGHRABI, O. A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 4, p. 466–475, 2015.

FERREIRA. Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade (2015): 2(3): 175-186. ISSN 2359-1412.

FRACCHIA, L. et al. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 144–162, 2015.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I. M. Applications of Biological Surface. 2008.

FUENTES, Maria S. et al. Selection of an actinobacteria mixed culture for chlordane remediation. Pesticide effects on microbial morphology and bioemulsifier production. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 2, p. 127-137, 2016.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current opinion in biotechnology**, v. 30C, p. 66–72, 1 jul. 2014.

GUDIÑA, R.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends Pharmacol. Sci.**, 34, 667–675, 2013.

HUANG, K. H.; CHEN, B. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. Optimization of exopolysaccharide production and diesel oil emulsifying properties in root nodulating bacteria. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 28, p.1367–1373, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. 113p. 2016.

INÈS, Mnif; SAHNOUN, Rihab; GHRIBI, Dhouha. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, 2017.

JOY, Sam et al. Biosurfactant Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Environment. In: **Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons**. Springer Singapore, 2017. p. 259-305.

KIM, J. S.; LEE, I. K.; YUN, B. S. A novel biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans* L3-GPY from a tiger lily wild flower, *Lilium lancifolium* Thunb. PloS one, v. 10, n. 4, p. e0122917, jan. 2015.

KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; MAKAROV, S.O.; LITVINENKO, L.V.; Cunningham, C.J.; Philip, J.C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. **Environ. Int.** 31, 155–161, 2005.

LEONEL, Tatiane Fernanda et al. Atividade emulsificante de exopolissacarídeo produzido por isolados de *Mesorhizobium huakuii* (LBMP-T01). **Ciência & Tecnologia**, v. 7, n. esp., 2015.

LIMA, João Marcelo Silva et al. Biosurfactants produced by *Microbacterium sp.*, isolated from aquatic macrophytes in hydrocarbon-contaminated area in the Rio Negro, Manaus, Amazonas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 39, n. 1, p. 13, 2017.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. **Int. J. Mol. Sci.** 12, 2463–2476, 2011.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids Surf. B** 102, 202–209, 2013.

MALAVENDA, R. et al. Biosurfactant production by Arctic and Antarctic bacteria growing on hydrocarbons. **Polar Biology**, v. 38, n. 10, p. 1565–1574, 2015.

MANOCHA, M.S.; San-Blas, G.; Centeno, S. Lipid composition of *paracciodioids brasilienses*: Possible correlation with virulence of different strains. **J. Gen. Microbiol.** 177, 147–154, 1980.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnol.**, v. 11, p. 558-565, 2012.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products., **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 1, p. 4116, 2015.

MONTERO-RODRÍGUEZ, DAYANA; ANDRADE, ROSILEIDE F. S.; RIBEIRO, DAFNE LUANA RAMOS; RUBIO-RIBEAUX, DAYLIN; LIMA, ROBERTO A.; ARAÚJO, HÉLVIA W. C. AND CAMPOS-TAKAKI, G. M. Bioremediation of Petroleum Derivative Using Biosurfactant Produced by *Serratia marcescens* UCP / WFCC 1549 in Low-Cost Medium. v. 4, n. August, p. 550–562, 2015.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.a.O., Biosurfactants in food industry, **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252–259, 2007.

NITSCHKE, Marcia et al. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Glauca Maria. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.



NITSCHKE, Marcia; SILVA, Sumária Sousa e. Recent Food Applications of Microbial Surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. just-accepted, p. 00-00, 2016.

PANJIAR, Neha; SACHAN, Shashwati Ghosh; SACHAN, Ashish. Biosurfactants: A Multifunctional Microbial Metabolite. In: **Microbial Applications Vol. 2**. Springer International Publishing, 2017. p. 213-229

PATHAK, K. V.; KEHARIA, H. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). **Biotech**, v. 4, p. 41–48, 2013.

PEREZ, KARLA J. et al. *Bacillus* spp. isolated from puba as a source of biosurfactants and antimicrobial lipopeptides. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

PORTELA VASCONCELOS, Ana Karine et al. A biodegradação de corantes têxteis associada ao cultivo de *Geobacillus stearothermophilus*: uma alternativa para produção de biosurfactante. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica**, v. 6, n. 1, p. 49-61, 2013.

PUNNIYAKOTTI, PARTHIPAN et al. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

RADZUAN, MOHD NAZREN; BANAT, IBRAHIM M.; WINTERBURN, JAMES. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99-105, 2017.

RAHMAN, PATTANATHU KSM; RANDHAWA, KAMALJEET K. Sekhon. Editorial: Microbiotechnology based surfactants and their applications. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

RANASALVA, N.; SUNIL, R.; POOVARASAN, G. **Importance of Biosurfactant in Food Industry**. v. 7, n. 5, p. 6–9, 2014.

RANDHAWA, KAMALJEET K. SEKHON; RAHMAN, PATTANATHU KSM. **Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market**. 2014.

RAY, SUBHAJITY. Production of biosurfactant using an isolated bacterial strain of *Bacillus sp* (m28). **Journal of microbiology and biotechnology research**, v. 2, n. 3, p. 402-415, 2017.

SAHA, PURBASHA; RAO, KV Bhaskara. Biosurfactants-A Current Perspective on Production and Applications. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 16, n. 1, p. 181, 2017.

SAKTHIPRIYA, N; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. International Biodeterioration & Biodegradation Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 105, p. 168–177, 2015.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SARAFIN, Y. et al. Kocuria marina BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 511–519, 2014.

SATPUTE, S. K. et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 436–450, 2010a.

SATPUTE, S. K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010b.

SATPUTE, Surekha K.; PŁAZA, Grażyna A.; BANPURKAR, Arun G. Biosurfactants' Production from Renewable Natural Resources: Example of Innovative and Smart Technology in Circular Bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, p. 46-54, 2017.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. **Análise da Conjuntura Agropecuária – Mandioca Safra 2015/2016**. 18p

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S.; KAPIL, S. **Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria**. [s.l.] SPRINGER BRIEFS IN MICROBIOLOGY Deepansh, 2016.

SILVA, MARIA APARECIDA M. et al. Production of Biosurfactants by *Pseudomonas* Species for Application in the Petroleum Industry. **Water Environment Research**, v. 89, n. 2, p. 117-126, 2017.

SIVASANKAR, P.; KUMAR, G. Suresh. Influence of pH on dynamics of microbial enhanced oil recovery processes using biosurfactant producing *Pseudomonas putida*: Mathematical modelling and numerical simulation. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 498-508, 2017.

SOUZA, Adriana Ferreira et al. Waste Soybean Oil and Corn Steep Liquor as Economic Substrates for Bioemulsifier and Biodiesel Production by *Candida lipolytica* UCP 0998. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1608, 2016.

SYAHRIANSYAH, Ummul Khair Mohd; HAMZAH, Ainon. Determination of optimum conditions and stability study of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* UKMP-4M5. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 20, n. 5, p. 986-1000, 2016.

TAMBEKAR DH, SHENDE AM, G. S. AND G. P.; PG. Isolation of Biosurfactant Producing *Exiguobacterium sp.* from Lonar Lake. **International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 437–442, 2013.

TAMBEKAR, D. H.; DHUNDALE, V. R. Studies on the Physiological and Cultural Diversity of Bacilli Characterized From Lonar Lake ( Ms ) India. **Bioscience Discovery, Department of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 34–39, 2012.

TIRONI, Luana Fernandes et al. Produtividade simulada de mandioca em cenários climáticos futuros do IPCC para o Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, p. 1-10, 2017.

UZOIGWE, Chibuzo et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

VARJANI, Sunita J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

ZHAO, Yi-He et al. Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. **Journal of basic microbiology**, v. 56, n. 2, p. 184-195, 2016.

# CAPÍTULO II

## **ARTIGO I**

### **Bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis* UCP 0146 utilizando uma metodologia ambientalmente adequada**

## **BIOEMULSIFICANTE PRODUZIDO POR *BACILLUS SUBTILIS* UCP 0146 UTILIZANDO UMA METODOLOGIA AMBIENTALMENTE ADEQUADA**

**P. C. V. S.Maia<sup>1,4</sup>, V. Pimentel Santos<sup>1,4</sup>, C. F. B. Costa Filho<sup>1,4</sup>, A.S. Fereira<sup>2,4</sup>; M. A.C.  
Luna<sup>2,4</sup>, T. A. L. Silva<sup>3,4</sup>, R. F. S. Andrade<sup>3,4</sup> and G. M. Campos-Takaki<sup>4,\*</sup>**

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.050-900 Recife, Pernambuco, Brasil.

E.mail: [patriciacvsm@gmail.com](mailto:patriciacvsm@gmail.com); [nessapimentel4519@hotmail.com](mailto:nessapimentel4519@hotmail.com)

<sup>2</sup> Doutorado Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Brasil

E.mail: [adrife.souza@gmail.com](mailto:adrife.souza@gmail.com) ; [macluna@bol.com.br](mailto:macluna@bol.com.br)

<sup>3</sup> Programa Nacional Post-Doutorado-CAPEL, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900 Recife-PE, Brasil.

E.mail: [ithalv@yahoo.com.br](mailto:ithalv@yahoo.com.br) ; [rosileide\\_fontenele@yahoo.com.br](mailto:rosileide_fontenele@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, Pernambuco, Brasil.

E.mail: [galba\\_takai@yahoo.com.br](mailto:galba_takai@yahoo.com.br)

**Resumo** - Neste trabalho foi investigado o potencial de *Bacillus subtilis* UCP 0146 na bioconversão do meio contendo 75 ml (100%) de efluente de mandioca (Manipueira) para obter bioemulsificante. A avaliação da produção foi realizada pela análise do índice de emulsão (IE<sub>24</sub>) e da tensão superficial (TS). A carga iônica, a estabilidade (térmica, iônica e pH medida pelo IE<sub>24</sub> e a viscosidade), a capacidade de remover e dispersar óleo e tingimento têxtil foram investigadas. *B. subtilis* produziu um bioemulsificador aniônico em meio contendo o efluentes de mandioca na condição 4 do projeto fatorial ( 9% do inóculo, a 35 ° C e agitação de 100 rpm) com TS de 39mN/m, IE<sub>24</sub> de 95.2 % e produz 2,69 gL<sup>-1</sup>. A estabilidade foi avaliada em diferentes pH e concentrações de NaCl (2-14) , como temperaturas (0-120°C), A dispersão do óleo (ODA) foi de (85,83 cm<sup>2</sup>) , reduziu a viscosidade do óleo queimado de motor (90,5 cP), como também a

remoção de 94,4% de petróleo em solo arenoso e a capacidade de descoloração do azul de metileno com resultado de 62,2%.

**Palavras-chave:** Bioemulsificante; manipueira; *Bacillus subtilis*; remoção de poluente.

## INTRODUÇÃO

Os bioemulsificantes são compostos com alto peso molecular, anfipáticos que apresentam como uma das características principais a atividade emulsificante. Possuem uma porção hidrofóbica (aminoácidos, peptídeos mono/dissacarídeos, polissacarídeos) e hidrofílica (ácidos graxos saturados ou insaturados), possibilitando a interação com fluidos de diferentes polaridades (óleo / água e água / óleo), formando microemulsões, como também proporcionando a aplicação para detergência, solubilização e emulsificação (Uzoigwe et al., 2015; Bardone et al., 2016; Souza et al., 2016).

Há uma diversidade de micro-organismos produtores de bioemulsificante, alguns apresentam maior capacidade de produção como as bactérias, e leveduras e em menor proporção os fungos filamentosos. Em relação as bactérias, destaca-se as da espécie *Bacillus*, em especial o *Bacillus subtilis*, que apresenta habilidade na produção de lipopeptídeo, degradação de cadeias longas de alcanos e redução da viscosidade de misturas de hidrocarbonetos em condições de anaeróbiose (Gudiña et al., 2013; Sakthipriya et al., 2015; Falode, 2017; Parthipan et al., 2017).

Os bioemulsificantes são citados como biomoléculas de destaque no setor terapêutico e biomédico, como também na agricultura, produtos farmacológicos, dermatologia, na indústria de alimentos, cosméticos e na biorremediação (Gudiña et al., 2013; Andrade et al., 2015; Uzoigwe et al., 2015; Satpute et al., 2017).

A utilização na indústria petroquímica ocorre devido aos bioemulsificantes serem considerados melhores que os produtos químicos sintéticos, devido as características de biodegradabilidade, baixa toxicidade e produção a partir de fontes renováveis, sendo aplicados nos processos de dispersão de hidrocarbonetos, formação de emulsão e redução da viscosidade (Regina and Silva, 2014; Andrade et al., 2015; De Almeida et al., 2016; Varjani and Upasani, 2017; Vecino et al., 2017).

A utilização dos resíduos agroindustriais como matéria-prima de baixo custo para a produção microbiana de bioemulsificante é uma estratégia bastante explorada no campo da biotecnologia, com o objetivo de reduzir os custos de produção e praticar políticas ambientais mais atuais (Jain et al., 2013; Selvam et al., 2016; Saha and Rao, 2017).

A manipueira é o efluente da mandioca resultante da produção industrial de farinha. A composição físico química é basicamente constituída por carboidratos, nitrogênio e diversos sais minerais caracterizando-se como suplemento com potencial significativo, possibilitando assim processos de síntese microbiana de emulsificantes a partir de sua conversão ( John and John, 2015; Elijah and Asamudo, 2016; Larissa et al., 2016).

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de um bioemulsificante por *Bacillus subtilis* UCP 0146 aplicando metodologia “ecofriendly” usando como substrato a manipueira, melhorando o conhecimento da estabilidade das propriedades na emulsão e aplicabilidade desta biomolécula.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### Micro-organismo e Manutenção

O micro-organismo utilizado foi *Bacillus subtilis* UCP 0146 isolado de sedimentos de mangue m (Rio Formoso- PE) e encontra-se depositado no Banco de Culturas UCP (Universidade Católica de Pernambuco) o qual é registrado no World Federation for Culture Collection (WFCC). O *Bacillus* é preservado no meio Agar nutriente (Peptona 5 g.L<sup>-1</sup>; Extrato de carne 3,0 g.L<sup>-1</sup> e Agar 18 g.L<sup>-1</sup>), a temperatura de 5°C, sendo transferido para o meio caldo nutriente (Peptona 5 g.L<sup>-1</sup>; Extrato de carne 3,0 g.L<sup>-1</sup>).

### Substrato

A manipueira, um subproduto da prensagem da mandioca (*Manihot esculenta*), foi gentilmente cedida pela casa de farinha localizada no município de Pombos –PE, Brasil.

### Produção do Bioemulsificante

O inóculo foi preparado transferindo-se células de *B.subtillis* do meio sólido para o caldo nutriente (Peptona 5 g.L<sup>-1</sup>; Extrato de carne 3,0 g.L<sup>-1</sup>), incubado à temperatura de 30°C por 12h a 150rpm. Em seguida, 5% do inóculo contendo 10<sup>8</sup> UFC /mL, foram transferidos para o meio de produção do bioemulsificante. Em frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo o efluente manipueira 75ml (100%) como descrito por Nitschke e Pastore (2006). Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, incubados por 96 horas, à temperatura de 30°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm e filtradas para separação do líquido metabólico livre de células. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### Planejamento Fatorial Simples

Os efeitos e interações entre o volume do inóculo (mL), temperatura (°C) e velocidade de agitação (rpm) para produção do bioemulsificante foram investigados utilizando um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> como níveis e fatores especificados na Tabela 1. O software STATISTICA versão 6.0 da StatSoft® foi utilizado para análise estatística dos resultados.

**Tabela 1. Níveis do planejamento fatorial**

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
<b>Inóculo (v/v)</b>	1	5	9
<b>Temperatura (°C)</b>	25	30	35
<b>Agitação (rpm)</b>	100	150	200

### Determinação do pH

O pH do meio de produção do bioemulsificante foi determinado no líquido metabólico utilizando potenciômetro modelo Orion potentiometer (Modelo 310), fabricado pela Orion Research Inc., (Cambridge, MA, USA).

### Determinação da Tensão Superficial (TS)

A tensão superficial do líquido metabólico livre de células foi medida em tensiômetro modelo Sigma 70 KSV Instruments Ltd., (Helsinki, Finlândia) pelo método do anel Du Nouy, à temperatura ambiente (KUYUKINA et al., 2005).

### **Determinação do Índice de Emulsificação (IE 24) e Avaliação da Estabilidade**

A determinação do Índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Os substratos hidrofóbicos utilizados foram óleos de origem vegetal (milho, canola, soja, azeite e soja pós-fritura) e derivados do petróleo (óleo diesel e óleo de motor queimado), sendo os resultados expressos em porcentagem, após 24h de observação. As amostras foram monitoradas a cada 30 dias, totalizando um período de 150 dias.

### **Análise Microscópica das Emulsões**

A análise microscópica das emulsões foi realizada após adicionar em tubos de ensaio 2mL de substratos hidrofóbicos (óleo de canola, soja, milho, óleo cozinha pós-fritura e óleo queimado de motor), 1mL do líquido metabólico livre de células coletado no intervalo de tempo de 24, 48, 72 e 96h, em seguida o líquido nos tubos foram homogeneizados em vórtex durante 1 minuto. As emulsões foram observadas em microscópio óptico com aumento de 40x e as imagens fotografadas em câmera digital.

### **Avaliação do Efeito do Bioemulsificante sobre a Viscosidade**

O efeito do bioemulsificante na viscosidade de diferentes óleos (óleo de motor queimado, óleo de milho, óleo de soja, óleo de pós-fritura de soja) foi investigado em tubos de ensaio contendo 6 mL dos respectivos óleos e 2 mL de solução do bioemulsificante a 1% (p/v). Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex durante 1 minuto e as viscosidades medidas a 25°C em viscosímetro automático (Brookfield (Middleboro, MA, USA; TC 500). O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e detergente comercial foram utilizados como controle. Os resultados de viscosidade foram expressos em cP e %.

### **Avaliação da Estabilidade**

A estabilidade do bioemulsificante foi avaliada no líquido metabólico livre de células submetido a diferentes pH (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14), concentrações de NaCl (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% e 14%) e temperaturas (0°C, 5°C, 70°C, 100°C e 120°C), sendo avaliado pelo índice de emulsificação após 24 h e reavaliados a cada 30 dias totalizando um período de 150 dias (perfil cinético).

### **Extração e Rendimento do Bioemulsificante**

O bioemulsificante de *B.subtilis* foi extraído a partir do líquido metabólico livre de células utilizando o método de precipitação com etanol de acordo com a metodologia de Nahato et al., (1996). Após a extração, o bioemulsificante bruto foi lavado duas vezes com água destilada, liofilizado e o rendimento expresso em g.L<sup>-1</sup>.

### **Determinação da Carga Iônica**

O caráter iônico foi investigada utilizando 100mg do bioemulsificante solubilizado em 5 mL de água destilada. As determinações de carga iônica foram determinadas utilizando potenciômetro Zeta modelo ZM3-D-G, Zeta Meter System 3.0+.

### **Identificação da Capacidade Dispersante**

A capacidade do bioemulsificante em dispersar óleo queimado de motor foi investigada seguindo a metodologia descrita por Morikawa et al. (1993). O aparecimento de uma zona clara após a adição do líquido metabólico contendo o bioemulsificante indica a capacidade dispersante do

bioemulsificante. O diâmetro da zona clara foi medido como área de deslocamento de óleo (ODA) e os resultados expressos em  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Aplicação do bioemulsificante em teste de dispersão de óleo e remoção de corante em água**

A habilidade do bioemulsificante em dispersar o óleo do motor queimado foi investigada utilizando 30mL de água destilada em placa de Petri (9 cm de diâmetro), seguindo-se a adição de 5mL do óleo do motor queimado à superfície da água e 1mL de caldo de cultura Sobrenadante. Um halo claro era visível sob a luz. A área deste círculo foi medida e calculada para determinar a área de deslocamento de óleo (ODA) usando a equação 1. O aparecimento de uma zona clara após a adição do líquido metabólico indica a capacidade de dispersão do bioemulsificante (Techaoei et al. 2011).

$$\text{ODA} = 227 (\text{radius})^2 \text{ c} \quad (1)$$

Outra aplicabilidade do bioemulsificante produzido por *B. subtilis* foi testada na remoção do corante azul de metileno (massa molecular - 333,6 g/mol) seguindo a metodologia proposta por Asku et al. (2010) modificada pela substituição do surfactante químico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) pelo bioemulsificante de *B. subtilis*. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo solução de azul de metileno preparada a partir de uma solução padrão ( $1\text{g.L}^{-1}$ ) e do bioemulsificante bruto ( $1\text{g.L}^{-1}$ ), suspenso em água destilada. A solução de corante sem bioemulsificante foi utilizada como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os frascos contendo solução de azul de metileno e bioemulsificante foram mantidos em agitação orbital de 150rpm durante 48 h com retirada de alíquotas de 5mL para determinação da cinética da biossorção do azul de metileno pelo bioemulsificante. Todas as amostras foram centrifugadas (4000rpm) durante 5 minutos e o sobrenadante analisado em

espectrofotômetro em comprimento de onda 663 nm. A eficiência da biossorção foi calculada de acordo com a seguinte equação 2:

$$\% \text{ Descoloração} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (2)$$

Onde: A- Absorbancia inicial e B- Absorbancia da solução descolorizada

### **Aplicação de Petróleo no Solo**

A capacidade do bioemulsificante remover petróleo em solo arenoso foi investigada utilizando 20 g de solo arenoso coletado da praia do Pina (Recife-PE), este solo foi impregnado com 5mL de petróleo e transferido para frasco de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Em seguida, 30mL do líquido metabólico livre de células, contendo o bioemulsificante, foi adicionado e os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, durante 48 horas e temperatura de 28°C de acordo com a metodologia de Nitschke e Pastore (2002). A remoção do petróleo foi realizada por lavagem do solo com hexano e os resultados expressos em porcentagem.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Bioemulsificante Produzido por *Bacillus subtilis* UCP 0146 em Meio Formulado com Manipueira

O bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis*, no meio formulado com manipueira 75 mL (100%), reduziu a tensão superficial da água de 72 (controle) para 39mN/m ( líquido metabólico) e resultou em índice de emulsificação de 95% usando óleo queimado de motor (Tabela 2). De acordo com Rahman, et al. (2015) os bioemulsificantes são caracterizados por não provocarem alterações significativas na redução da tensão superficial entre líquidos e elevada atividade emulsificante (RAHMAN, et al. 2015). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a biomolécula produzida por *B. subtilis* possui características de um bioemulsificante.

**Tabela 2. Índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) para diferentes substratos hidrofóbicos pelo bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis* em meio formulado com manipueira**

Tensão superficial (mN/m)	Índice de emulsificação ( $E_{24}$ )	
	Substratos hidrofóbicos	Percentual - %
38,2	Óleo de Soja	50
38,0	Óleo de Milho	65
38,2	Óleo de Canola	50
38,4	Azeite	90
38,7	Óleo soja pós-fritura	50
37,8	Querosene	40
37,2	Diesel	-
39,0	Óleo queimado de motor	95

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados do planejamento fatorial completo  $2^3$ , realizado para avaliar o efeito da temperatura, agitação e volume do inóculo na produção do bioemulsificante após 150 dias. Os resultados sugerem que o bioemulsificante produzido na condição 4 do planejamento fatorial (temperatura 35°C, 100rpm e inóculo de 9%) manteve

elevada capacidade emulsificante (95,2%) usando óleo queimado de motor como substrato hidrofóbico após 150 dias (IE<sub>150</sub>) (Tabela 3). No entanto, o bioemulsificante produzido na condição 6 do planejamento resultou em valores de IE<sub>24</sub> (95%) similares ao da condição 4, porém não manteve estabilidade durante 150 dias (IE<sub>150</sub>) com o óleo queimado de motor, sendo desta forma escolhida a condição 4 do planejamento para os estudos em diante.

**Tabela 3. O índice de emulsificação EI<sub>24</sub> (%) e EI<sub>150</sub> dias (%) em diferentes substratos hidrofóbicos do bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis* de acordo com o planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>**

Condição	Óleo queimado de motor		Óleo de Soja		Óleo de Soja pós fritura		Óleo de Milho		Óleo de Canola	
	EI <sub>24</sub>	EI <sub>150</sub>	EI <sub>24</sub>	EI <sub>150</sub>	EI <sub>24</sub>	EI <sub>150</sub>	EI <sub>24</sub>	EI <sub>150</sub>	EI <sub>24</sub>	EI <sub>150</sub>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	85,0	65,0	20,0	4,0	10,0	5,0	15,0	11,0	15,0	10,0
2	95,0	75,0	1,0	45,0	25,0	5,0	10,0	10,0	30,0	10,0
3	75,0	25,0	10,0	10,0	45,0	10,0	10,0	10,0	15,0	8,0
4	95,2	95,0	10,0	5,0	15,0	10,0	10,0	25,0	20,0	15,0
5	95,0	80,0	50,0	5,0	50,0	10,0	25,0	15,0	35,0	15,0
6	95,0	65,0	50,0	5,0	50,0	5,0	65,0	7,0	50,0	7,0
7	87,0	73,0	5,0	0,0	35,0	5,0	13,6	10,0	5,0	10,0
8	90,0	75,0	5,0	5,0	40,0	5,0	8,7	8,0	5,0	5,0
9	93,3	86,0	10,0	5,0	26,1	20,0	15,0	15,0	8,7	5,0
10	87,5	60,0	16,7	15,0	56,5	25,0	10,0	15,0	10,0	5,0
11	87,5	75,0	45,0	10,0	87,0	25,0	10,0	15,0	15,0	10,0
12	92,0	85,0	43,5	10,0	90,9	25,0	18,2	15,0	10,0	10,0

**Níveis: Inoculo 10<sup>8</sup> CFU/mL (v/v): -1 (1) , 0 (5) , +1 (9);**

**Temperatura (°C): -1 (25) , 0 (30) , +1 (35);**

**Agitação (rpm): -1 (100) , 0 (150) , +1 (200)**

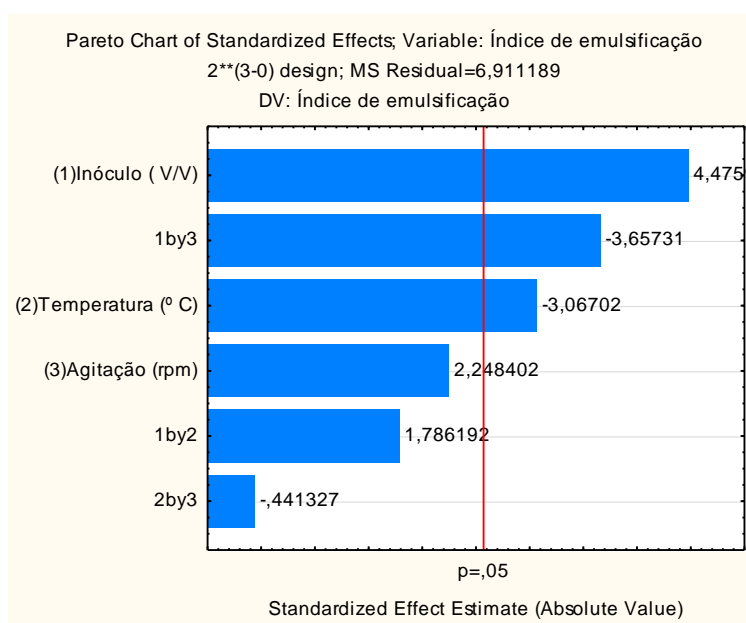


Na condição 4 do planejamento fatorial (temperatura 35°C, 100rpm e inóculo de 9%) o rendimento do bioemulsificante bruto foi de 2,69g.L<sup>-1</sup>.

### Determinação da influência da temperatura, agitação e volume do inóculo na produção de bioemulsificante por *Bacillus subtilis*

Os efeitos das variáveis independentes: volume do inóculo, temperatura e velocidade de agitação sobre o índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>), usando óleo queimado de motor como substrato hidrofóbico esta representado no Diagrama de Pareto (Figura 1) com nível de confiança de 95%. De acordo com este diagrama o aumento do volume do inóculo, exerceu um efeito positivo significativo sobre o aumento do IE<sub>24</sub>. Pode também ser observado que a interação da variável volume do inóculo e da variável agitação exerceu um efeito negativo significativo sobre o aumento do IE<sub>24</sub>.

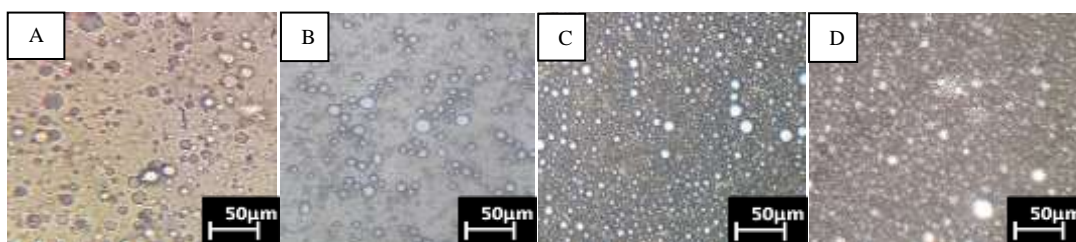
**Figura 1.** Diagrama de Pareto para determinação da influência do inóculo, temperatura e agitação na produção de bioemulsificante de *Bacillus subtilis*



## Caracterização das Gotículas das Emulsões Formadas Usando Óleo Queimado de Motor

As emulsões formadas pelo bioemulsificante, utilizando o óleo queimado de motor como substrato hidrofóbico, foram analisadas por microscopia ótica (Figura 2) e caracterizadas quanto as principais propriedades e percentual de emulsificação, sendo importante para avaliação da estabilidade das emulsões (Tabela 4). Os resultados demonstraram a ocorrência da formação de emulsões do tipo água em óleo, na condição 4 do planejamento fatorial (tamanho do inóculo de 9% com cultivo à 35°C e agitação de 100 rpm), em meio contendo manipueira a 75 mL (100%). A partir do líquido metabólico livre de células cultivado à 24h (Figura 2A) foi observada a formação de emulsões com gotas grandes, instáveis termodinamicamente, com aspecto globoso, heterogêneo e índice de emulsificação de 80%.

**Figura 2.** Características microscópica das gotas formadas a partir do bioemulsificante: (A) Líquido metabólico à 24h; (B) Líquido metabólico à 48h; (C) Líquido metabólico à 72h; (D) Líquido metabólico à 96h.



Na Figura 2B usando o líquido metabólico cultivado às 48h não ocorreram mudanças significativas, porém foi observada flocculação das gotas e maior espaço livre. Já na Figura 2C, usando o líquido metabólico cultivado a 72 h, houve a formação de gotas com dimensões menores, em maior número, homogêneas, estáveis e com índice de emulsificação de 90%. Entretanto, a formação de emulsões com gotas de menor diâmetro (0,3 µm), globosas,

homogêneas, estáveis e com elevado índice de emulsificação (90%) ocorreu com o líquido metabólico cultivado a 96h (Figura 2D). Características similares de estabilidade, tamanho e tipo das emulsões formadas pelo surfactante químico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) são mencionadas por Souza et al. (2016) e compatíveis com as observadas neste estudo usando o líquido metabólico cultivado à 96h (Figura 2D).

**Tabela 4 - Características e propriedades do bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis* em meio formulado com manipueira**

Tempo de cultivo (h)	Descrição emulsificante	Diâmetro das gotas ( $\mu\text{m}$ )	Índice de emulsificação- $E_{24}$ (%)	Estabilidade termodinâmica
24	Gotas grande, globosas e heterogêneas	1-30	80	Instável
48	Gotas grande, globosas e heterogêneas	1-30	84	Instável
72	Gotas pequenas. Compactas e homogêneas	0,5-20	90	Estável
96	Gotas pequenas, compactas e homogêneas	0,3-20	92	Estável
*SDS (controle)	Gotas pequenas e homogêneas	2,5-12	100	Estável

#### **Efeito do Bioemulsificante de *B. subtilis* na Viscosidade do Óleo Queimado de Motor**

O líquido metabólico livre de células contendo o bioemulsificante foi capaz de formar um sistema estável com o óleo queimado de motor e reduzir a viscosidade deste óleo de 170cP para 90,5cP após 24h de repouso da amostra. Esta condição foi acompanhada durante 150 dias para identificar a capacidade do bioemulsificante em manter estável a viscosidade da

emulsão formada. Os resultados demonstraram significativas variações durante 150 dias como de 68,8cP à 90,5cP. No entanto, ficou evidente que o bioemulsificante de *B.subtilis* manteve a estabilidade da viscosidade em até 72h.

### **Estabilidade do Bioemulsificante Avaliada pela Viscosidade e Índice de Emulsificação**

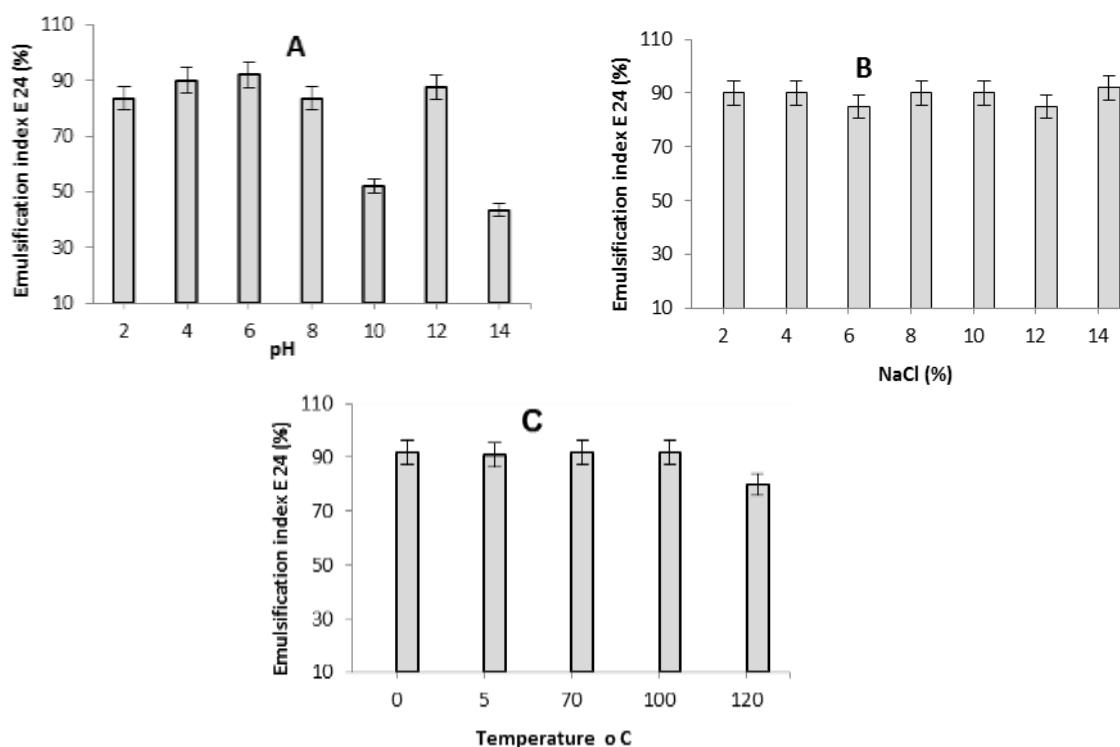
Segundo Willumsen e Karlson (1997), a principal característica dos agentes emulsificantes é sua capacidade de manter a estabilidade de substâncias com diferentes graus de polaridade representados por valores de emulsificação (IE<sub>24</sub>) acima de 50% após 24 horas. Neste contexto, o bioemulsificante de *Bacillus subtilis* foi capaz de manter elevada capacidade emulsificante com valores de IE<sub>24</sub> acima de 80% após variações bruscas de pH (exceção pH 14) (Figura 3A). Santos et al., (2013), obtiveram resultados semelhantes, obtendo valores significativos em toda faixa de pH testadas, exceto quando o biossurfactante foi exposto ao pH 12. Por outro lado, SARUBBO et al. (2007), relatam que valores de pH extremos são responsáveis pela desnaturação dos componentes protéicos pelo aumento da ionização aumentada.

A estabilidade avaliada após exposição a elevadas concentrações de NaCl (Figure 3B), demonstra que as emulsões com óleo queimado de motor permaneceram estáveis em todas as concentrações testadas, com valores em torno de 90%. Esses resultados foram semelhantes ao estudo de Silva-Andrade et al., (2014), ao obterem bioemulsificante de *Cunninghamella echinulata* com capacidade emulsificante de até 12 % de NaCl após cultivo em meio formulado com milhocina e óleo residual de soja.

A estabilidade térmica do bioemulsificante (Figure 3C) foi investigada entre 0 e 120°C. De acordo com os resultados, as emulsões com óleo de motor queimado mantiveram-se estáveis

em até 100°C. Estudos realizado por Souza et al., (2016) foram similares aos obtidos neste trabalho pela obtenção de emulsões estáveis com valores de 65% e 80% à 100 °C utilizando óleo de motor como substrato hidrofóbico.

**Figura 3.** Estabilidade do bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis* UCP 0146 em função do índice de emulsificação: (A) pH; (B) NaCl e (C) Temperatura



Em adição, a estabilidade do bioemulsificante foi investigada pela determinação da viscosidade. Os resultados demonstram que o pH foi o fator que mais influenciou na redução da viscosidade das emulsões formadas com óleo queimado de motor resultando em valores entre 10 à 20cP, com exceção em pH 4 (Tabela 6). De modo diferencial, Jara et al., (2013) obtiveram aumento significativo da viscosidade do óleo de motor queimado, de 170 cP para 423,6 cP pelo biossurfactante produzido pela bactéria *Geobacillus stearothermophilus*. Segundo Wei et al., (2005), biossurfactantes capazes de reduzir a viscosidade de óleos e são adequados para uso na indústria de petróleo, pois a baixa viscosidade facilita a remoção considerável do óleo. Portanto,

a significativa atividade emulsificante de *B. subtilis* e a estabilidade desta biomolécula em ampla faixa de pH, temperaturas extremas e em altas concentrações de NaCl sugere o possível uso do bioemulsificante de *B. subtilis* na indústria de petróleo.

**Tabela 5. Estabilidade do bioemulsificante após exposição a diferentes pH, concentrações de NaCl e temperaturas avaliado pela determinação da viscosidade**

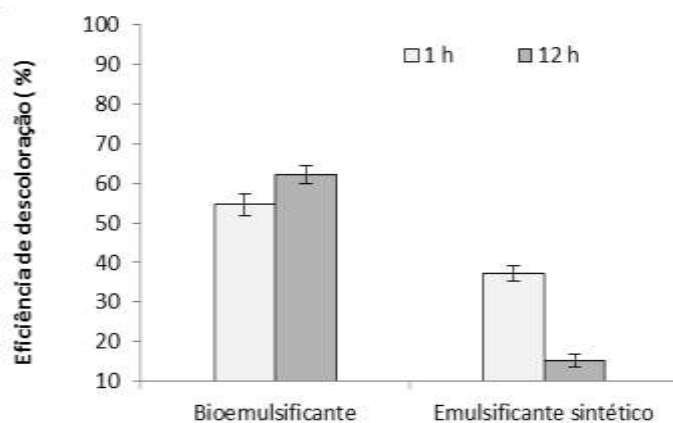
Ensaio	Determinação de Viscosidade (cP) / Condição						
	2	4	6	8	10	12	14
pH							
cP	8.20	11.00	17.00	8.30	13.50	10.30	5.40
NaCl (%)							
cp	20.50	79.40	13.10	7.86	38.40	30.20	30.70
Temperature(°C)							
cP	15.10	12.00	12.40	16.30	7.86		

#### **Eficiência do bioemulsificante na adsorção de corante e na dispersão e remoção de óleo queimado de motor**

O bioemulsificante de caráter aniônico produzido por *Bacillus subtilis* no meio selecionado do planejamento fatorial (condição 4) foi investigado quanto ao potencial de adsorção do corante catiônico azul de metileno. De acordo com os resultados, o biomulsificante de *B.subtilis* conseguiu remover 62,2% do corante solubilizado em água após 12 horas (Figura 4) quando comparado com o emulsificante sintético comercial. Para Prévost et. al. (2010) a remoção de corantes catiônicos por agentes aniônicos é explicada por ser o bioemulsificante e o azul de metileno compostos de cargas opostas que em solução aquosa entram em equilíbrio

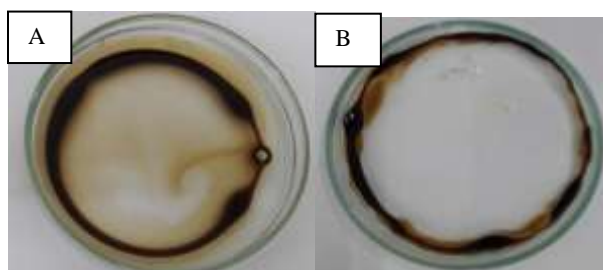
formando os pares de íons hidrofóbicos, ou complexos associados, ou ainda agregados entre o corante catiônico e o surfactante aniônico em solução.

**Figura 4.** Decolorização de corante azul de metileno pelo bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis*



Outra aplicabilidade do bioemulsificante de *Bacillus subtilis*, presente no líquido metabólico livre de células, foi na dispersão e remoção de óleo queimado de motor. Os resultados demonstraram que o bioemulsificante apresentou excelente capacidade dispersante com valores de 85,38 cm<sup>2</sup> ODA (Figura 5A) quando comparado com o controle (Figura 5B). Além disso, o bioemulsificante de *B. subtilis* foi capaz de remover 94,4% do óleo queimado de motor impregnado em solo arenoso.

**Figura 5.** Dispersão do óleo queimado de motor pelo bioemulsificante de *Bacillus subtilis*: (A) Dispersão pelo bioemulsificante e (B) Dispersão com detergente comercial



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Bacillus subtilis* foi capaz de produzir um bioemulsificante de caráter aniônico com excelente estabilidade térmica, iônica e do pH a partir da bioconversão de manipueira como único componente do meio de cultivo. Além disso, o bioemulsificante foi capaz de reduzir a viscosidade de petroderivado, como também remover o óleo e adsorver corante têxtil, o que indica sua possível aplicação em processos de biorremediação em solo e água.

A utilização da manipueira para a produção de bioemulsificante por UCP 0146 é uma metodologia ambientalmente adequada, uma vez que promove o aproveitamento de um resíduo regionalmente disponível, gerado pela indústria de alimentos. O bioemulsificante é uma biomolécula que apresenta propriedades importantes com maior potencial biotecnológico para biorremediação na remoção de poluentes e descoloração de corantes. Por outro lado, o bioemulsificante foi capaz de formar emulsões estáveis por até cinco meses, sugerindo grande potencial para aplicações na indústria farmacêutica e cosmética, bem como no processo de bioremediação. Além disso, o *Bacillus subtilis* UCP 0146 mostrou potencial de uso de resíduos recalcitrantes como uma fonte alternativa de carbono para a produção do bioemulsificante, proporcionando uma vantagem para a produção industrial.



## AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos ao Convênio de Pós-Graduação da CAPES / CNPq - Brasil; FACEPE; e a UNICAP meu reconhecido com gratidão.

## NOMENCLATURA

IE <sub>24</sub>	índice de emulsificação (%)
cP	centipoise
ODA	área de dispersão do óleo (cm <sup>2</sup> )
SDS	sodium dodecyl sulfate
SFA	ácido graxo saturado
MUFA	ácidos graxos monoinsaturados
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
ÍNDICE P/S	índice poliinsaturado/saturado
UFC	unidade formadora de colônia (mL)

## REFERÊNCIAS

- Andrade, R. F. S., Antunes, A. A., Lima, R. A., Araújo, H. W. C., Resende-Stoianoff, M. A., Franco, L. O. and Campos-Takaki, G. M.: Enhanced Production of an Glycolipid Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP / WFCC1556 for Application in Dispersion and Removal of Petroderivatives, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 4(7), 563–576 (2015).
- Bardone, E., Bravi, M., Keshavarz, T., Secato, J. F. F., Coelho, D. F., Rosa, N. G. J., Costa, L. D. L. and Tambourgi, E. B.: Biosurfactant Production Using *Bacillus Subtilis* and Industrial Waste as Substrate, doi:10.3303/CET1649018, 49(April) (2016).
- Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G.: Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, doi:0099-2240/87/020224 , 53(2), 224–229 (1987).
- De Almeida, D. G., Soares Da Silva, R. de C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M. and Sarubbo, L. A.: Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances, *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2016.01718, 7(OCT ) (2016).
- Elijah, A. and Asamudo, N.: Molecular Characterization and Potential of Fungal Species Associated with Cassava Waste, *Br. Biotechnol. J.*, doi:10.9734/BBJ/2016/16559, 10(4), 1–15 (2016).
- Falode, O. A. M. A. A.: Evaluation of Indigenous Biosurfactant- producing Bacteria for De-emulsification of Crude Oil Emulsions Evaluation of Indigenous Biosurfactant-producing Bacteria for De-emulsification of Crude Oil Emulsions, Mariam Adebawale Adeleke, 18(3)(January), doi:10.9734/MRJI/2017/29156, 1–9 (2017).
- Gudiña, E. J., Rangarajan, V., Sen, R. and Rodrigues, L. R.: Potential therapeutic applications of biosurfactants, *Trends Pharmacol. Sci.*, 34(12), doi:10.1016/j.tips.2013.10.002667–675, (2013).
- Jain, R. M., Mody, K., Joshi, N., Mishra, A. and Jha, B.: Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation, *Int. J. Biol. Macromol.*, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.08.03062, 52–58 (2013).
- John, U. S. and John, M. C.: Production and Application of Microbial Surfactant from Cassava Wastewater, *Am. J. Eng. Technol. Soc.*, 2(4), 85–89 (2015).
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Makarov, S. O., Litvinenko, L. V., Cunningham, C. J. and Philp, J. C.: Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system, *Environ. Int.*, 31(2), doi:10.1016/j.envint.2004.09.009, 155–161 (2005).
- Larissa, K., Nat aacute ssia, J. C., Glauca, M. P., Ana, P. R. S., Vander, de F. M. and Simone, D. G.: Adsorption of copper, zinc and lead on biosurfactant produced from cassava wastewater,

African J. Biotechnol., 15(5), 110–117, doi:10.5897/AJB2015.14994 (2016).

Nitschke, M. and Pastore, G. M.: Biosurfactantes: Propriedades e aplicações, *Quim. Nova*, 25(5), 772–776, doi:10.1590/S0100-40422002000500013 (2002).

Nitschke, M. and Pastore, G. M.: Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater, *Bioresour. Technol.*, 97(2), 336–341, doi:10.1016/j.biortech.2005.02.044 (2006).

Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K. S. M., Murugan, K. and Rajasekar, A.: Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1, *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2017.00193, 8(FEB), (2017).

Prévost, S., Wattebled, L., Laschewsky, A. and Gradzielski, M.: Formation of monodisperse charged vesicles in mixtures of cationic gemini surfactants and anionic SDS, *Langmuir*, doi:10.1021/la103976p, 27(2), 582–591 (2011).

Rahman, P. K. S. M. and Sekhon Randhawa, K. K.: Editorial: Microbiotechnology based surfactants and their applications, *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2015.01344, 6(DEC), 2014–2016, ( 2015).

Regina, N. and Silva, A.: *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 NA, 2014.

Saha, P. and Rao, K. V. B.: Biosurfactants- A Current Perspective on Production and Applications Key Words , 6268 (2017).

Sakthipriya, N., Doble, M. and Sangwai, J. S.: Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, doi:10.1016/j.ibiod.2015.09.004, 105, 168–177 ( 2015).

Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Salgueiro, A. A. and Sarubbo, L. A.: Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor, *J. Pet. Sci. Eng.*, 105, 43–50, doi:10.1016/j.petrol.2013.03.028 (2013).

Satpute, S. K., Płaza, G. A. and Banpurkar, A. G.: Management Systems in Production Engineering biosurfactants ' production from renewable natural resources : example of innovativeand smart technology, doi:10.1515/mspe-2017-0007, (2017).

Selvam, K., Selvankumar, T., Rajiniganth, R., Srinivasan, P., Sudhakar, C., Senthilkumar, B. and Govarthanam, M.: Enhanced production of amylase from *Bacillus* sp. using groundnut shell and cassava waste as a substrate under process optimization: Waste to wealth approach, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, doi:10.1016/j.cbab.2016.06.013, 7, 250–256 (2016).

Souza, A. F., Rodriguez, D. M., Ribeaux, D. R., Luna, M. A. C., Lima E Silva, T. A., Andrade, R. F. S., Gusmão, N. B. and Campos-Takaki, G. M.: Waste Soybean Oil and Corn Steep Liquor

as Economic Substrates for Bioemulsifier and Biodiesel Production by *Candida lipolytica* UCP 0998, *Int. J. Mol. Sci.*, doi:10.3390/ijms17101608, 17(10), 1–18 (2016).

Suyane, M., Dantas, M., Rolim, M. M. and Duarte, A. D. S.: Production and morphological components of sunflower on soil fertilized with cassava wastewater, 77–82 (2017).

Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J. and Rahman, P. K. S. M.: Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches, *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2015.002456(APR), 1–6 (2015).

Varjani, S. J. and Upasani, V. N.: Critical Review on Biosurfactant Analysis , Purification and Characterization Using Rhamnolipid as A Model Biosurfactant, *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2017.02.047 (2017).

Vecino, X., Cruz, J. M., Moldes, A. B. and Rodrigues, L. R.: Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges, *Crit. Rev. Biotechnol.*, doi:10.1080/07388551.2016.12690530(0), 1–16 (2017).

Wei, Q. F., Mather, R. R. and Fotheringham, A. F.: Oil removal from used sorbents using a biosurfactant, *Bioresour. Technol.*, doi:10.1016/j.biortech.2004.04.00596(3), 331–334 (2005).

Willumsen, B., Christian, G. D. and Ruzicka, J.: Flow injection renewable surface immunoassay for real time monitoring of biospecific interactions., *Anal. Chem.*, 69(17), 3482–9 [online] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286161> (1997).

## CONCLUSÕES GERAIS

- O *Bacillus subtilis* UCP 0146 foi capaz de produzir um bioemulsificante com propriedades semelhantes aos emulsificantes quimicamente sintetizados;
- A produção do bioemulsificante foi beneficiada pelo uso da manipueira, como estratégia biotecnológica e sustentável, favorecendo a redução dos custos de produção;
- A manipueira pode ser utilizada como fonte alternativa para a formulação de meio de produção de bioemulsificante;
- O *B.subtillis* UCP 0146 produziu o bioemulsificante no meio constituído por 100% de manipueira.
- O bioemulsificante produzido por *B. subtilis* possui estabilidade diante das variações térmica, iônica e do pH;
- O bioemulsificante possui importante propriedade na redução da viscosidade de óleo queimado de motor;
- O bioemulsificante possui potencial de uso na remoção e dispersão de óleo queimado de motor;
- O bioemulsificante possui potencial de uso na adsorção de corante têxtil azul de metileno.