

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM NOVO HAMBURGO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

BÁRBARA IEGLI TECH

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR
Bacillus amyloliquefaciens P5 E *Bacillus megaterium* DSMZ 32
A PARTIR DO SORO DE QUEIJO**

**NOVO HAMBURGO
2019**

BÁRBARA IEGLI TECH

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE POR
Bacillus amyloliquefaciens P5 E *Bacillus megaterium* DSMZ 32
A PARTIR DO SORO DE QUEIJO**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karla Joseane Perez

**NOVO HAMBURGO
2019**

Catálogo de Publicação na Fonte – CIP

T255a Tech, Bárbara Iegli.
Avaliação da produção de biossurfactante por *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e *Bacillus megaterium* DSMZ 32 a partir do soro de queijo / Bárbara Iegli Tech. – Novo Hamburgo, 2019.
53 f.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karla Joseane Perez.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso Superior Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade de Novo Hamburgo, 2019.

1. Biossurfactante. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Microorganismos. 4. Trabalho de Conclusão de Curso. I. Perez, Karla Joseane. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Simone Semensatto. CRB10/1778

BÁRBARA IEGLI TECH

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
Bacillus amyloliquefaciens P5 E *Bacillus megaterium* DSMZ 32
A PARTIR DO SORO DE QUEIJO**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karla Joseane Perez

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karla Joseane Perez
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

Bióloga Bruna Coelho de Andrade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/UNIVATES

Engenheiro M.^o Douglas José Faria

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Karla Perez, pela orientação, paciência e oportunidade concedida a mim de trabalhar com uma profissional que tanto agregou para meu crescimento acadêmico nesta reta final.

À minha família, em especial minha mãe Flávia, minha irmã Amanda e meu ex-padrasto Gilson, pelo amor, carinho e confiança incondicionais durante todos esses longos anos. Suas palavras e apoio foram revitalizantes em muitos momentos difíceis.

Aos meus avós Elmo e Lourdes e aos meus dindos Cláudia e Carlinhos (*in memoriam*), com os quais pude contar desde a infância até os dias atuais. Sou muito grata a todo apoio, ainda que vocês não tenham decorado o nome completo do meu curso.

Ao Eduardo, pelo amor, companheirismo e troca de vivências durante grande parte desta caminhada. É uma alegria dividir meus dias ao teu lado.

Aos amigos que a universidade oportunizou ao longo do curso: Vanessa, Brisa, Niverson e outros tantos presentes em semestres e épocas diferentes. Sem vocês, suas alegres risadas e nossas calorosas discussões antes das provas, certamente a graduação não seria a mesma.

Aos amigos do peito que tornaram o dia a dia mais leve, os fins de semana mais agradáveis e este ciclo completo mais cheio de vida. Meu agradecimento especial à Érika, que esteve comigo nos altos e baixos, mostrando a mim o verdadeiro significado da amizade.

À Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, da qual sinto muito orgulho de ter sido aluna durante estes anos. Em especial, aos professores que me inspiraram através de sua qualidade e amor à docência: Prof.^a Débora, Prof. Marcelo e Prof. Éder. O comprometimento de vocês com o ensino é contagiante.

Por fim, agradeço ao Prof. Marco Antônio Ayub, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS), por ceder prontamente uma das cepas utilizadas, e à mestranda Thais Livramento, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS/UFRGS), pela gentileza em disponibilizar o tensiômetro digital, seu tempo e atenção nas análises tensiométricas. Sem a parceria e generosidade de vocês, este estudo não estaria completo.

“Podemos julgar nosso progresso pela coragem dos
nossos questionamentos e pela profundidade das
nossas respostas, nossa vontade de abraçar o
verdadeiro ao invés daquilo que nos faz sentir bem.”

Carl Sagan

RESUMO

Biossurfactantes são substâncias com propriedades emulsificantes e detergentes que têm potencial de aplicação em diversas áreas. Estas biomoléculas apresentam muitas vantagens frente aos surfactantes quimicamente sintetizados. No entanto, o alto preço de sua produção afeta o uso dessas substâncias orgânicas. Uma possibilidade para a redução do custo produtivo é a utilização de fontes alternativas de nutrientes, como subprodutos agrícolas sem destino. O soro de queijo é rico em nutrientes, e sua alta carga orgânica lhe confere potencial uso como substrato. O presente trabalho teve por objetivo utilizar o soro oriundo da fabricação de queijo como substrato na produção de biossurfactante a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e *Bacillus megaterium* DSMZ 32. Estes micro-organismos foram cultivados no meio teste Caldo Soro de Queijo (CSQ) e no meio controle comercial *Brain Heart Infusion* (BHI). Foram variadas a temperatura de incubação do pré-inóculo e inóculo em três condições diferentes (30 °C e 30 °C; 30 °C e 42 °C; 37 °C e 42 °C, respectivamente), e o meio com células e o sobrenadante livre de células obtidos ao fim de cada condição foram analisados. A produção de biossurfactante foi avaliada através de três métodos: a) Índice de Emulsificação (E_{24}), que resultou em 67,3% de emulsificação no meio teste CSQ com cultivo de *Bacillus megaterium* DSMZ 32 com Éter de Petróleo, e 61,1% de emulsificação com *Bacillus amyloliquefaciens* P5 em solução com Hexano; b) Análise Tensiométrica com tensiômetro digital, que indicou redução discreta na tensão superficial de 83% das amostras, demonstrando melhores resultados em porcentagem de redução para *Bacillus amyloliquefaciens* P5 em meio CSQ (39%) e em meio BHI (19,5%) e c) Atividade Hemolítica, que apresentou hemólise positiva para todas as amostras de sobrenadantes e do meio contendo células. Os resultados permitiram garantir a produção de biossurfactante pelos dois micro-organismos testados (*Bacillus amyloliquefaciens* P5 e *Bacillus megaterium* DSMZ 32) a partir do meio Caldo Soro de Queijo.

Palavras-chave: Biossurfactantes. Resíduos agroindustriais. Micro-organismos.

ABSTRACT

Biosurfactants are substances with emulsifying and detergent properties that have potential of application in several areas. These biomolecules have many advantages over chemically synthesized surfactants. However, the high price of its production affects the use of these organic substances. One possibility for reducing the cost of production is the use of alternative sources of nutrients, such as agricultural byproducts with no destination. Cheese whey is rich in nutrients, and its high organic load gives it potential use as a substrate. The purpose of this work was to use whey derived from cheese production as a substrate in the production of biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* P5 and *Bacillus megaterium* DSMZ 32. These microorganisms were cultured in the test medium Cheese Serum Broth (CSB) and the commercial control medium *Brain Heart Infusion* (BHI). The incubation temperature of the pre-inoculum and inoculum were varied in three different conditions (30 °C and 30 °C, 30 °C and 42 °C, 37 °C and 42 °C), and the medium with cells and the supernatant free cells obtained at the end of each condition were analyzed. The biosurfactant production was evaluated through three methods: a) Emulsification Index (E_{24}), which resulted in 67.3% emulsification in CSQ test medium with *Bacillus megaterium* DSMZ 32 culture with Petroleum Ether, and 61.1% emulsification with *Bacillus amyloliquefaciens* P5 in solution with Hexane; b) Tensiometric Analysis with digital tensiometer, which indicated a discrete reduction in surface tension of 83% of samples, showing better results in percentage reduction for *Bacillus amyloliquefaciens* P5 in CSB medium (39%) and in BHI medium (19.5%) and c) Hemolytic Activity, which showed positive hemolysis for all samples of supernatants and medium containing cells. The results allowed to guarantee the production of biosurfactant by the two microorganisms tested (*Bacillus amyloliquefaciens* P5 and *Bacillus megaterium* DSMZ 32) from the Cheese Serum Broth medium.

Keywords: Biosurfactants. Agroindustrial waste. Microorganisms.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Bacillus</i>	12
3.1.1 <i>Bacillus megaterium</i>	12
3.1.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	12
3.2 FENÔMENOS DE SUPERFÍCIE	13
3.3 SURFACTANTES	14
3.3.1 Propriedades dos surfactantes	15
3.3.1.1 Emulsificação.....	16
3.3.1.2 Detergência.....	17
3.4 BIOSSURFACTANTES	18
3.4.1 Biossíntese dos biossurfactantes	20
3.4.2 Métodos de detecção da produção de biossurfactantes	23
3.4.2.1 Índice de Emulsificação	23
3.4.2.2 Análise Tensiométrica.....	23
3.4.2.3 Atividade Hemolítica.....	23
3.4.3 Aplicações dos biossurfactantes	24
3.5 SORO DO QUEIJO	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 MICRO-ORGANISMOS	29
4.2 DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO CSQ.....	29
4.3 CONDIÇÕES DOS CULTIVOS	31
4.3.1 Preparação do Pré-inóculo	32
4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	33
4.4.1 Índice de Emulsificação (E₂₄)	33
4.4.2 Análise Tensiométrica	34
4.4.3 Atividade Hemolítica	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO CALDO SORO DE QUEIJO (CSQ).....	36
5.2 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (E ₂₄).....	37
5.3 ANÁLISE TENSIOMÉTRICA	42

5.4 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	45
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Em tempos em que nossa sociedade foca na sustentabilidade, em fontes renováveis e na diminuição de impactos ambientais, os biossurfactantes apresentam elevada relevância. Estes compostos possuem em sua estrutura molecular características tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, o que lhes confere propriedades emulsificantes e detergentes (FAKRUDDIN, 2012). Estas propriedades, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial da água, têm potencial de aplicação em diversas áreas de produção, como indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica, agrícola e petrolífera, bem como na biorremediação de solos e águas (NITSCHKE, 2002). Ademais, os biossurfactantes possuem a vantagem de serem produzidos por micro-organismos, em contraste aos surfactantes quimicamente sintetizados, mais agressivos ao meio ambiente. Entre as vantagens apresentadas pelos biossurfactantes, ressalta-se sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, atuação em amplo espectro de temperatura, pH e salinidade, além de possuírem maior eficiência frente à mesma concentração de surfactante químico (VIJAYAKUMAR, 2015).

Segundo Ehrhardt (2015), a produção de biossurfactantes como insumo para processos industriais é promissora, uma vez que a demanda por surfactantes aumentou 300% dentro da indústria química na América. Essa demanda crescente abre espaço para a potencial concorrência entre os surfactantes quimicamente sintetizados e os surfactantes microbiológicos. O grande ponto negativo que aflige o uso dessas substâncias é o alto preço de produção, que ainda se apresenta inviável, de tal modo que mais estudos sobre a otimização da produção de biossurfactantes fazem-se necessário.

Kronemberger (2007) salienta o potencial uso de cepas de micro-organismos melhoradas geneticamente para o aumento do rendimento e produção de biossurfactante, adequando e otimizando as condições de cultivo. Nitschke (2002) também avalia perspectivas futuras, ressaltando a possibilidade de alteração das estruturas químicas dos biossurfactantes, bem como de suas propriedades físicas a fim de torná-los mais eficientes a partir de alterações gênicas, biológicas ou até mesmo químicas.

Uma possibilidade para a redução do custo produtivo é a utilização de fontes alternativas de nutrientes de baixo ou nenhum custo, de modo a aproveitar componentes até então sem destino específico. Neste contexto, a utilização de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial se mostra vantajosa, uma vez que muitos desses subprodutos são tratados como resíduos, descartados em solo ou corpos d'água, demandando tratamento prévio para diminuição da carga orgânica poluidora. Utilizando estes subprodutos, reduz-se simultaneamente o custo na produção de biossurfactante e o custo do tratamento do resíduo. Dessa forma, o impacto ambiental é minimizado, e é dada uma aplicação para algo que até então era descartado (COSTA, 2012; THAVASI, 2007).

O soro do queijo é um subproduto líquido obtido na etapa de coagulação ácida ou enzimática na fabricação de queijo. Sua composição é rica em nutrientes, como sais minerais, sacarídeos, proteínas, lipídios e vitaminas do complexo B. Estima-se que, a cada 1 kg de queijo produzido, sejam gerados 9 kg de soro, e que nele permaneçam aproximadamente 50% dos nutrientes do processamento do queijo (BRASIL, 2005; KROLOW, 2013). A alta carga orgânica do soro gerado lhe confere potencial uso como substrato e rica fonte de carbono e nutrientes. Todavia, se descartado de forma indevida, este é altamente poluente (REGHELIM, 2018).

Mesmo conhecendo-se os prejuízos causados pelo descarte indevido do soro não tratado e o grande potencial de uso na produção de alimentos funcionais, as pesquisas e novas alternativas sobre futuras aplicações ainda são iniciais e escassas. Deste modo, o presente trabalho visa a uma nova abordagem de aplicação para este que é um efluente industrial de alto impacto ambiental, utilizando-se soro de queijo oriundo de queijaria como meio base para produção e desenvolvimento de meio Caldo Soro de Queijo (CSQ) que será usado como substrato para o crescimento de duas espécies selecionadas de *Bacillus* com fins de otimizar a produção de biossurfactantes comparando-se com um meio comercial *Brain Heart Infusion* (BHI).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho se dividem em objetivo geral e objetivos específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é utilizar o soro oriundo da fabricação de queijo como substrato para a produção de biossurfactante a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e *Bacillus megaterium* DSMZ 32 e comparar os resultados obtidos com um meio comercial controle (BHI).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver um meio de cultivo com base de soro de queijo e meio mineral com adição de uma solução de micronutrientes, extrato de levedura 1,5% (v/v) e glicose 1% (v/v);
- b) Definir a composição ótima do soro tratado, através de testes de acidificação e fervura para precipitação proteica;
- c) Utilizar o meio de cultivo desenvolvido com soro oriundo da fabricação de queijo (CSQ) como substrato para a produção de biossurfactante a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e *Bacillus megaterium* DSMZ 32;
- d) Analisar os níveis de produção de biossurfactante frente a variações de temperatura de incubação do pré-inóculo e inóculo;
- e) Avaliar a produção de biossurfactantes por *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e *Bacillus megaterium* DSMZ 32 por meio do teste de atividade hemolítica, do índice de emulsificação (E_{24}) e da medida da tensão superficial a partir do crescimento nos dois meios de cultivo (BHI e CSQ) e comparar os resultados obtidos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção, será apresentada uma revisão da literatura abordando os principais temas relativos ao trabalho proposto.

3.1 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus*

Segundo Baron (1996), as espécies deste gênero são gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, possuem forma de bastonetes e formam esporos. Estão presentes em ambientes variados, e poucas espécies são patógenos ocasionais em humanos, sendo em sua maioria espécies saprófitas inofensivas. Atualmente, conforme o site *LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, do pesquisador J. P. Euzéby, há citação de 379 espécies e de 7 subespécies no gênero *Bacillus* spp.

3.1.1 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium é um micro-organismo presente em muitos ambientes diferentes, principalmente no solo. Seu tamanho pode chegar a 4 µm de comprimento e 1,5 µm de diâmetro. Estudos relativos à produção de biossurfactantes por esta bactéria apontam os glicolipídeos ou glicolipopeptídeos como sendo os biossurfactantes produzidos (BUNK, 2010; THAVASI, 2007).

Segundo Vijayakumar (2015), glicolipídeo é a classe de biossurfactantes mais ampla. Estas moléculas são formadas, como o nome sugere, por cadeias de carboidratos ligadas a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Dentro desta classe, os biossurfactantes glicolipídicos mais conhecidos são os rhamolipídeos, trehaloselipídeos e os soforolipídeos.

3.1.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

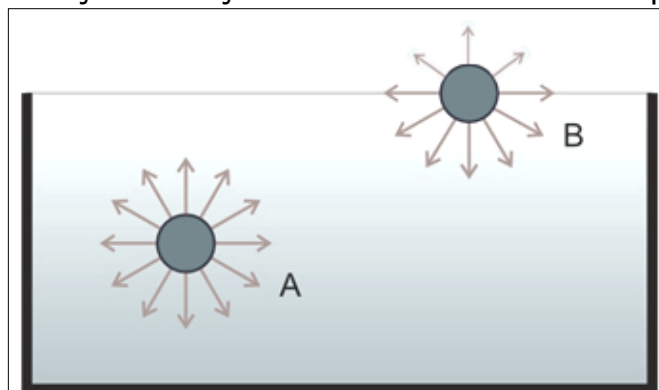
Bacillus amyloliquefaciens é uma bactéria normalmente presente no solo. Por décadas, houve debate em relação a seu *status* como espécie, ou subespécie de

Bacillus subtilis. Atualmente, este micro-organismo é considerado uma espécie. Estudos indicam lipopeptídeos como os biossurfactantes produzidos por esta bactéria. Estas moléculas são estruturalmente formadas por peptídeos cíclicos ligados a uma cadeia de ácidos graxos. Esta é uma classe de biossurfactante amplamente conhecida pela sua atividade antimicrobiana (VERA, 2017).

3.2 FENÔMENOS DE SUPERFÍCIE

Na superfície dos líquidos, as forças atrativas são diferentes das forças em seu interior, também conhecido como *bulk*. Isto ocorre em consequência de as moléculas superficiais estarem interagindo tanto com as moléculas do líquido quanto com as moléculas da camada limitante gasosa, geralmente ar atmosférico. Desta interação distinta entre as moléculas superficiais e ambas as fases gasosa e líquida, destacam-se duas forças: força coesiva (A), que envolve a mesma substância, ou seja, é a força entre a molécula líquida superficial e as moléculas líquidas vizinhas; e força adesiva (B), gerada entre espécies diferentes, neste caso, entre a molécula líquida superficial e as moléculas gasosas de sua redondeza. Na figura 1, fica evidente a atuação das forças citadas sobre duas moléculas e a predominância da força coesiva em relação à força adesiva na molécula presente na superfície, gerando um vetor resultante para o interior da fase, o que contrai a superfície espontaneamente, no objetivo de se reduzir a razão superfície/volume (CHANG, 2010; DALVIN, 2011).

Figura 1 – Ação de forças em moléculas do *bulk* e superficiais



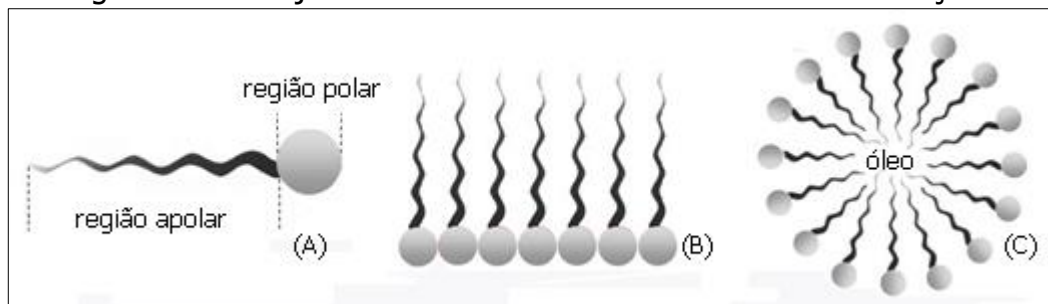
Fonte: Adaptado de Araújo (2013)

As moléculas no *bulk* estão mais estáveis, enquanto as moléculas da superfície, devido a essa disparidade de forças, se encontram mais energizadas. Em decorrência desta diferença energética entre moléculas do *bulk* e moléculas superficiais, é gerada a tensão dita superficial. Segundo Pirôllo et al. (2008), a tensão superficial, em termos físicos, pode ser definida como a energia necessária para aumentar a superfície em uma unidade de área. Esta tensão pode variar de acordo com a adição de solutos, podendo aumentar se o soluto for um sal inorgânico ou diminuir até uma concentração limite de soluto adicionado, como é o caso dos surfactantes.

3.3 SURFACTANTES

Os surfactantes, também conhecidos como agentes tensoativos ou anfifílicos – por possuírem interação mediana com a água – tendem a migrar até a superfície da solução ou interface de dois fluidos imiscíveis e originar ali películas orientadas. Nurfarahin (2018) aponta que, por muitos anos, os surfactantes foram classificados de acordo com seu grau de dissociação em água, sendo eles divididos em aniônicos, catiônicos e não-iônicos. Segundo Yalçin (2018), a reorientação destas moléculas nas zonas interfaciais ocorre porque sua estrutura possui uma porção hidrofílica, solúvel em meio aquoso e uma região hidrofóbica, que não apresenta afinidade pela água, como ilustrado na figura 2 (A).

Figura 2 – Arranjos dos surfactantes em diferentes concentrações



Fonte: Adaptado de Cartes (2016)

Mulligan (2009) retrata que, com o aumento da concentração, estas moléculas tendem a tomar a mesma orientação e o objetivo deste rearranjo é minimizar a repulsão entre os grupos hidrofóbicos e a água (ou qualquer que seja o solvente polar),

deixando seus grupos apolares na interface solvente-ar e, assim, minimizando o contato com a água, de tal modo que a tensão superficial da mesma diminui, pois ocorre um desarranjo de sua superfície outrora estabilizada, como apresentado na figura 2 (B).

No entanto, como dito anteriormente, os surfactantes reduzem a tensão superficial de um líquido até um valor limite. Isto ocorre porque, após uma determinada concentração de surfactante, a superfície do solvente torna-se saturada e incapaz de suportar mais moléculas na região limitante. Como essas moléculas ficam impedidas de se deslocarem para a superfície, inicia-se a formação de agregados coloidais de diversas estruturas, como vesículas esféricas, lamelas ou micelas, estrutura exemplificada pela figura 2 (C), que compreende em seu interior pequenas quantidades do soluto apolar (ATKINS, 2012).

A formação da primeira micela indica a concentração crítica micelar (CMC). Após este ponto, a tensão superficial e outras propriedades físicas do solvente não sofrem mais alterações, pois as micelas, diferentemente dos surfactantes em superfície, não produzem efeitos na tensão desta solução. Portanto, utilizar a CMC é a maneira mais segura e simples de se analisar o comportamento coloidal e eficiência de um surfactante, uma vez que pode ser determinada por qualquer variação brusca de uma propriedade física desta solução, especialmente a descontinuidade da condutividade molar (ATKINS, 2012; VERA, 2017).

3.3.1 Propriedades dos surfactantes

A atividade tensoativa presente nessas moléculas devido sua estrutura anfipática, como visto, permite a diminuição da tensão superficial da água quando estas são adicionadas em solução. Esta característica concede aos surfactantes propriedades emulsificantes e detergentes (SCHWARTZ, 1985).

3.3.1.1 Emulsificação

Emulsão é uma mistura entre dois ou mais líquidos que normalmente seriam imiscíveis. O exemplo clássico é a mistura de água e óleo formando uma emulsão de óleo em água, na qual o óleo é a fase dispersa e a água é o meio de dispersão. O contrário também pode ocorrer, desde que o óleo esteja presente em quantidade consideravelmente maior que a água. Neste caso, tem-se uma emulsão de água em óleo (SPEIGHT, 2017).

As emulsões originam-se após a intensa agitação do sistema heterogêneo, formando – no caso de um sistema com inferior quantidade de óleo – gotículas de óleo dispersas em água. No entanto, quando o sistema volta ao repouso, inicia-se a coalescência destas gotículas oleosas que, por não apresentarem afinidade pelo meio aquoso, fusionam-se umas às outras quando próximas. Desse modo, ao diminuir a área interfacial, se diminui também a interação repulsiva água-óleo. Com o tempo, o sistema água e óleo retorna à heterogeneidade, com a fase mais densa no fundo e a menos densa na parte superior (SALAGER, 1999).

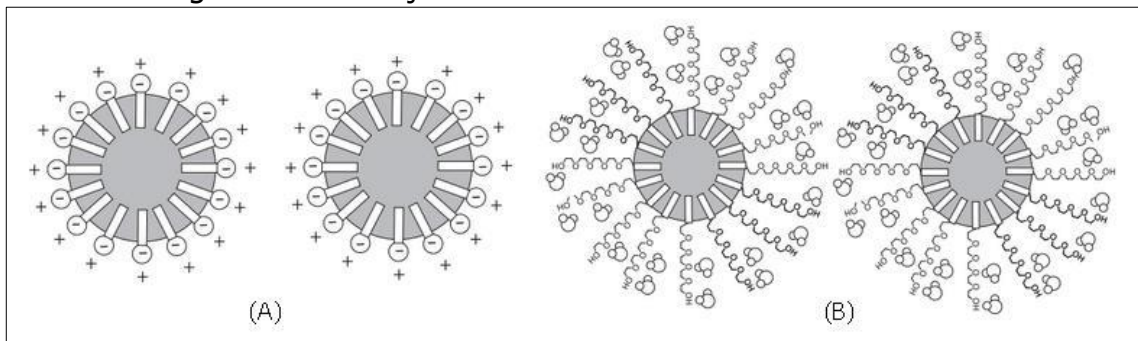
A adição de surfactante acima da concentração crítica micelar nessa emulsão possibilitará às moléculas surfactantes um sistema rico em áreas interfaciais água e óleo, dado que cada gotícula apresenta uma superfície única. As moléculas surfactantes organizadas em micelas tendem a ocupar estas superfícies de contato água-óleo, no objetivo de se estabilizarem. Segundo Atkins (2012), surfactantes químicos possuem a tendência de aglomeração em grupos de 100 ou menos para formar as estruturas micelares devido sua característica eletrostática repulsiva entre os grupos polares. O número de micelas diminui à medida em que as mesmas se desfazem para compor o entorno das gotículas de óleo dispersas em água. A fase dispersa, agora em conjunto com o surfactante, encontra-se mais estabilizada, retardando-se notavelmente sua coalescência.

Como descrito por Salager (1999), os surfactantes químicos em geral são iônicos, isto é, possuem carga verdadeira em sua região polar e hidrofílica. Portanto, ao se organizarem na superfície da gotícula, cria-se uma dupla camada elétrica entre a porção hidrofílica negativa do surfactante e a molécula polar de água com sua região

mais positiva próxima ao surfactante. Assim, as gotículas não coalescem pois apresentam a mesma carga eletrostática em suas superfícies, repelindo-se quando próximas, como indicado na figura 3 (A).

Biossurfactantes, representados pela figura 3 (B), em geral são não-iônicos e, sem carga verdadeira, o impedimento da coalescência se dá devido à geometria da molécula, que normalmente apresenta regiões apolares muito longas, dificultando estericamente o contato entre duas gotículas.

Figura 3 – Interação de surfactantes iônicos e não iônicos

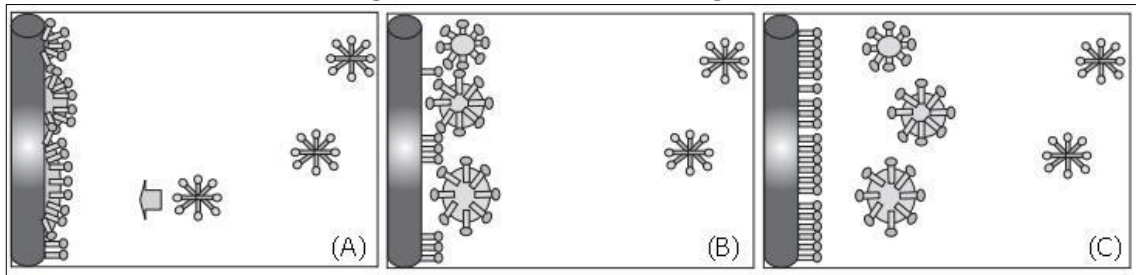


Fonte: Adaptado de Daltin (2012)

3.3.1.2 Detergência

A propriedade detergente dos surfactantes é descrita de forma semelhante às emulsões, ocorrendo o mesmo efeito de desarranjo da estrutura micelar para que suas moléculas interajam com o substrato aderido de forma indesejada à superfície sólida. Desse modo, o surfactante orienta-se na superfície livre da sujidade até envolvê-la completamente, como ilustrado na figura 4 (A). Todavia, as moléculas ainda se encontram aderidas ao sólido. Neste ponto, ocorre o que Daltin (2012) caracteriza como "efeito cunha" e está representado na figura 4 (B), um rearranjo exercido pelo surfactante para aumentar o tamanho da superfície da sujidade e permitir assim que mais moléculas surfactantes possam se estabilizar. A sujidade vai aos poucos perdendo sua adesão e deformando-se para formar gotículas envoltas de surfactante, como representado na figura 4 (C).

Figura 4 – Efeito da Detergência



Fonte: Adaptado de Daltin (2012)

O efeito da detergência leva à formação de uma emulsão posterior devido à saída da sujeira em água. A interação do surfactante com a superfície sólida garante também que a sujeira não retorne à superfície, uma vez que há a repulsão das micelas recém-formadas com as moléculas surfactantes agora estáveis na região (MILLER, 2002).

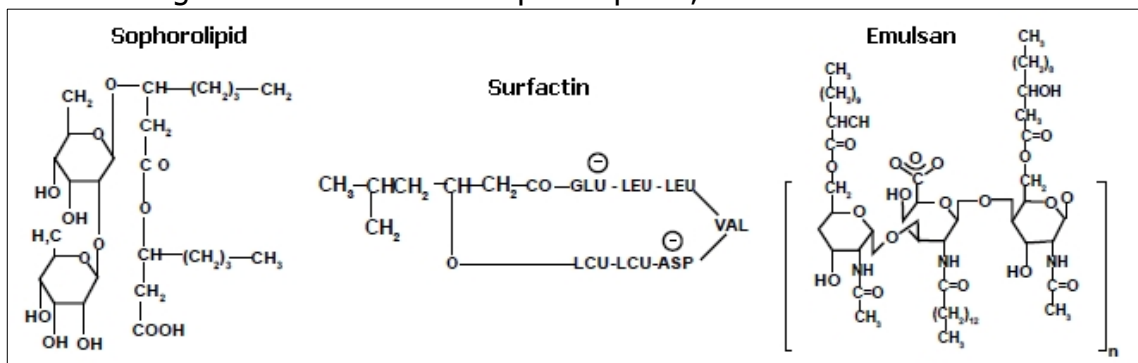
3.4 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são moléculas com as mesmas propriedades anfipáticas que os surfactantes químicos, contudo, são produzidas por micro-organismos. Após sua produção, elas permanecem na superfície celular ou são excretadas (FAKRUDDIN, 2012). Sua estrutura molecular possui uma região polarizada que pode ser iônica, não-iônica ou anfótera, e estes grupamentos são em geral ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos. A porção apolar dos biossurfactantes, por sua vez, geralmente é formada por uma proteína ou peptídeo, apresentando cadeias hidrocarbonadas de 10 a 18 carbonos (EHRHARDT, 2015). Estas moléculas são em geral consideradas metabólitos secundários e podem ser produzidas por diferentes micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, ainda que cada um utilize diferentes fontes de carbono para a produção de seus respectivos agentes biológicos tensoativos (YALÇIN et al, 2018).

Enquanto os surfactantes químicos são classificados de acordo com sua polaridade, essas substâncias são divididas conforme sua estrutura molecular, seu micro-organismo de origem ou seu peso molecular, e nesta última categoria, os biossurfactantes são divididos em baixo e alto peso molecular. Esta divisão está

associada às funções que estas moléculas exercem na célula, sendo as de alto peso molecular mais eficazes na estabilização de emulsões água e óleo, enquanto os biossurfactantes de baixo peso molecular reduzem mais a tensão superficial e interfacial. A figura 5 ilustra a estrutura de alguns dos biossurfactante mais comuns. As classes mais estudadas e conhecidas atualmente são os glicolipídios, fosfolipídios, biopolímeros, ácidos graxos, lipídeos neutros e os lipopeptídeos. A classe dos biossurfactantes lipopeptídicos é a mais efetiva em relação às anteriores, sendo produzida por bactérias do gênero *Bacillus*, em especial pela espécie *Bacillus subtilis* (BARROS, 2008; NURFARAHIN, 2018).

Figura 5 – Estrutura do sophorolipídeo, surfactina e emulsan



Fonte: Adaptado de Fakruddin (2012)

Esta gama de moléculas estruturalmente distintas possui diversos papéis fisiológicos para os micro-organismos que as produzem, estando presentes em diversos processos biológicos do metabolismo, movimento e defesa celular. Os biossurfactantes também apresentam funções imunomoduladoras, antimicrobiana e de incremento na solubilidade de substratos através da membrana celular. Suas propriedades singulares e vantajosas têm os tornado de grande interesse para a pesquisa e a indústria (VIJAYAKUMAR, 2015; BANAT, 2014).

Um bom surfactante, segundo Mulligan (2005), tem potencial para diminuir a tensão superficial da água de 75 para 35 mN·m⁻¹, sendo a surfactina – o biossurfactante mais amplamente estudado – capaz de reduzir esta tensão para 25 mN·m⁻¹. Essa eficiência é notória também em comparação com os surfactantes quimicamente sintetizados, que, para atingir a mesma redução de tensão superficial provocada pelas

moléculas biotensoativas, devem estar presentes na solução em concentração consideravelmente maior.

Os biossurfactantes apresentam outras vantagens frente aos surfactantes químicos. Dentre suas características benéficas, destacam-se a biodegradabilidade, uma vez que estas moléculas são compostos orgânicos facilmente degradados por micro-organismos; baixa ou nenhuma toxicidade frente aos surfactantes sintetizados quimicamente, o que permite sua aplicação direta nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética; podem ser produzidos por uma gama de substratos renováveis de baixo custo e disponíveis em grande quantidade, como resíduos agroindustriais; são também moléculas altamente estáveis diante a variações de pH, temperatura e salinidade, o que permite sua utilização em processos industriais e ambientais associados a condições extremas (FAKRUDDIN, 2012; KOSARIC, 2001; KRISHNASWAMY, 2008; MCLNERNEY et al., 1990; BARROS, 2008).

3.4.1 Biossíntese dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam estruturas moleculares diferentes entre si, de modo que a característica comum entre estas biomoléculas é sua anfipaticidade. Isto significa que os micro-organismos podem produzir um ou mais biossurfactantes diferentes, como apresentado por Santos et al. (2016) na tabela 1, na qual são elencados alguns dos biossurfactante existentes e seus micro-organismos produtores.

Tabela 1 – Tipos de biossurfactante e seus micro-organismos produtores
(continua)

Tipo de biossurfactantes	Micro-organismos produtores
Glicolipídeos	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Tsukamurelaa</i> sp.
Rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia rubidea</i>
Soforolipídeos	<i>Candida apícola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter</i> sp.

Tabela 1 – Tipos de biossurfactante e seus micro-organismos produtores

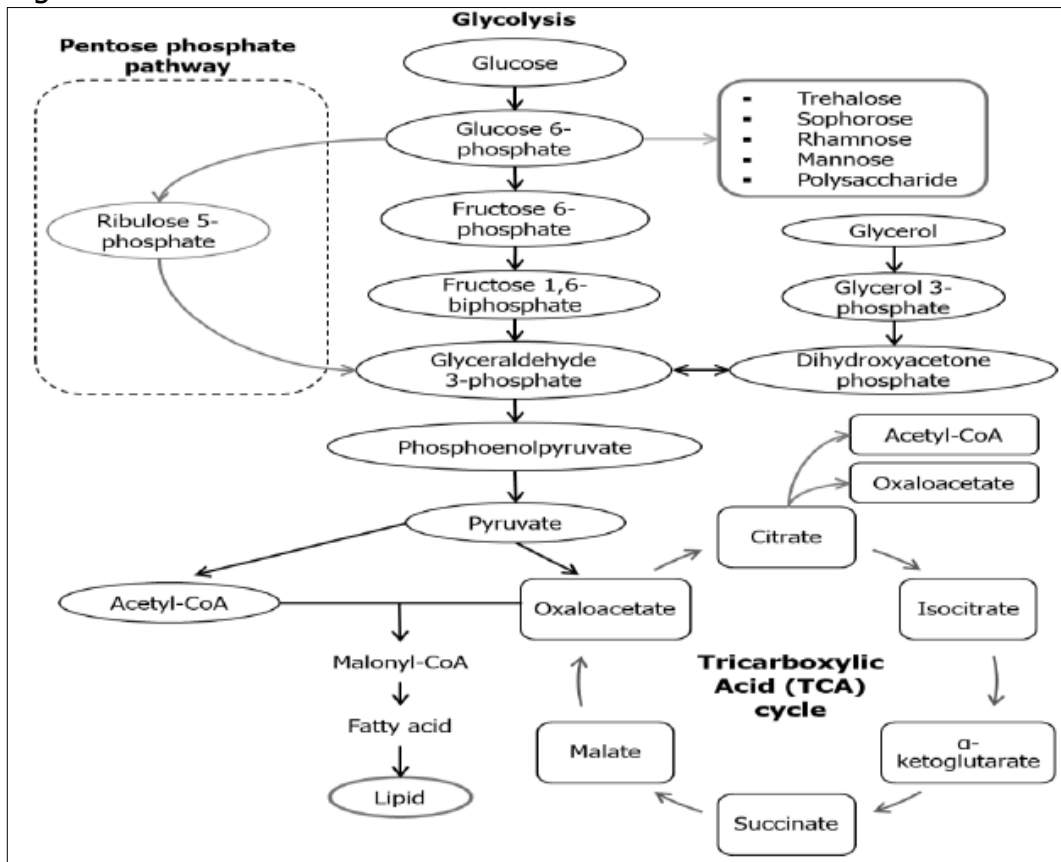
(conclusão)

Tipo de biossurfactantes	Micro-organismos produtores
Ácidos Graxos	<i>Penicillium spiculisporum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i>
Lipopolissacarídeos	<i>Acinobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Candida lipolytica</i>

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016)

Uma vez que os biossurfactantes existentes são diferentes entre si, as rotas metabólicas para a produção destes também são. Em vias gerais, como descrito por Nurfarahin et al. (2018), a biossíntese dos biossurfactante é dividida entre a produção da metade hidrofílica e a produção da metade hidrofóbica por vias metabólicas diferentes. Como apresentado na figura 6, a síntese da porção hidrofílica parte de um substrato solúvel em água, como um carboidrato, enquanto a região hidrofóbica é produzida por gorduras e óleos. Assim, a via lipogênica é responsável pela produção da parte hidrofóbica do biossurfactante, tal como a via glicolítica se encarrega de produzir a região hidrofílica.

Figura 6 – Rotas Metabólicas envolvidas na biossíntese dos biossurfactante



Fonte: Adaptado de Nurfahin et al. (2018)

Como a Glicose-6-fosfato é o precursor da região hidrofílica, e o Oxaloacetato é o precursor da produção de lipídeos, pode-se utilizar um carboidrato como fonte de carbono na produção de ambas regiões estruturais do biossurfactante. No entanto, conforme descrito por Salihu (2009), a composição, a quantidade e a atividade emulsificante das moléculas biossurfactantes não dependem apenas da cepa ou do substrato utilizado, mas também das condições químicas e dos parâmetros físicos do meio de cultivo. É importante garantir as fontes de carbono adequadas, fonte de nitrogênio bem como a correta relação carbono-nitrogênio. Limitações nutricionais influirão na rota metabólica do micro-organismo podendo gerar estresse e diminuição na produção e consumo de substrato. Parâmetros como temperatura, aeração, velocidade de agitação, e pH, também influenciam a quantidade de biossurfactante produzido.

3.4.2 Métodos de detecção da produção de biossurfactantes

Há muitos métodos descritos na literatura para a detecção e avaliação da produção destas biomoléculas. As seções seguintes visam descrever os métodos empregados neste trabalho.

3.4.2.1 Índice de Emulsificação

O Índice de Emulsificação é um teste que analisa a habilidade do biossurfactante em emulsificar uma variedade de compostos hidrofóbicos, como também a estabilidade desta emulsão. O resultado é uma porcentagem representando a altura da emulsão relativa à altura total do sistema. Valores acima de 50% são considerados altos (COOPER; GOLDENBERGER, 1987).

3.4.2.2 Análise Tensiométrica

Este método leva em conta a capacidade tensoativa dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial dos líquidos. Para esta medição, é utilizado um aparelho denominado tensiômetro, que, através do contato de uma lamínula-sensor com a superfície do líquido, mede a tensão ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) até o rompimento deste contato. O maior valor mensurado é considerado como a tensão presente na superfície do líquido testado. As tensões superficiais do líquido puro, juntamente com as tensões superficiais do líquido contendo biossurfactante, são comparadas para verificação da redução da tensão após a adição do biossurfactante.

3.4.2.3 Atividade Hemolítica

Este teste utiliza o meio de cultura ágar sangue na análise do potencial de produção de biossurfactante a partir da bactéria pesquisada em questão. O procedimento consiste na repicagem das amostras em ágar sangue e incubação das mesmas a 37 °C de 48 a 72 h. Após este período, as colônias são então observadas,

de modo que as zonas claras que as envolvem indicam a ocorrência de hemólise, isto é, lise de eritrócitos, o que sugere a presença de biossurfactantes (HIDAYATI et al., 2011).

3.4.3 Aplicações dos biossurfactantes

Em virtude de suas características anteriormente citadas, os biossurfactantes são amplamente empregados em uma vasta área. Na indústria alimentícia, eles atuam reduzindo a tensão superficial e interfacial, o que estabiliza as emulsões formadas, mantendo as propriedades reológicas, de consistência e textura dos produtos aerados e com dispersão de fase. Essas mesmas características de viscosidade e consistência do produto também são importantes nos cosméticos, nos quais os biossurfactantes substituem satisfatoriamente os surfactantes sintetizados quimicamente. São utilizados também como agentes antiadesivos, de modo que a hidrofobicidade da superfície de interesse é alterada, afetando a adesão de micro-organismos nestes locais e impedindo a formação de biofilmes indesejáveis (VIJAYAKUMAR, 2015; BANAT, 2014).

A biorremediação é outra área que se beneficia da aplicação destas moléculas, uma vez que os biossurfactantes aumentam e estabilizam a interação entre água e óleo devido seu alto poder de emulsificação, tornando possível a remoção ou diminuição dos poluentes a níveis de concentração aceitáveis tanto em solos contaminados como em derramamentos de óleo no oceano (MORAIS, 2012). No setor de mineração, foram utilizados no processo de flotação e separação de dois minerais incapazes de ser separados por substâncias químicas convencionais, conforme relatado e descrito por Nitschke (2002).

Na área agrícola, os biossurfactantes podem ser usados também como agentes dispersante na formulação de herbicidas em conjunto com a substância ativa, que geralmente é hidrofóbica. Ainda neste ramo de aplicação, Fakruddin constatou em 2012 suas aplicações como eficientes biopesticidas, fazendo o controle de pragas com biossurfactantes lipopeptídicos que são produzidos por uma gama de bactérias e que possuem atividade inseticida contra certas espécies de moscas, mostrando-se com

grande potencial de aplicação futura. Na área medicinal, o autor ressalta que a toxicidade quase nula destas biomoléculas permite sua vasta aplicação fazendo uso de sua atividade antimicrobiana, antiadesiva e antiviral. Fernandes (2007) destaca ainda suas propriedades antitumorais, imunomoduladoras e inibidoras de enzimas.

3.5 SORO DO QUEIJO

O soro do queijo é um subproduto líquido obtido na etapa de coagulação ácida ou enzimática na fabricação de queijo. Possui cor amarela-esverdeada e sabor entre ácido e adocicado (BRASIL, 2005). Sua composição é rica em nutrientes, 8 a 10% de sais minerais, dentre eles, os principais são cloreto de sódio e o cloreto de potássio, representando mais de 50% dos sais presentes. Há ainda sais de cálcio, importantes na construção e manutenção óssea; 4,8% de lactose, um dissacarídeo importante do leite; 0,75% de proteínas solúveis, principalmente globulina e albumina; e 0,5% de lipídios. É composto também, em quantidades inferiores, por ácido láctico e ácido cítrico, ureia e ácido úrico, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 piridoxina, B5 e B12), além de ácido pantotênico, ácido fólico e biotina (GONZÁLEZ, 1996; KROLOW, 2013).

As proteínas presentes no soro apresentam, em várias quantidades, todos os aminoácidos essenciais, o que lhe confere valor biológico ainda maior, determinando assim uma alta qualidade nutricional destas moléculas (SUÍÇA, 2002). Na tabela 2, apresentada abaixo, os aminoácidos essenciais são relacionados com sua quantidade respectiva no leite humano, nas proteínas do soro e na caseína, esta última a principal e mais abundante proteína do leite.

Tabela 2 – Conteúdo de aminoácidos essenciais (mg/g de proteína)

(continua)

Aminoácido	Leite Humano	Proteínas do soro	Caseína
Isoleucina	45	76	54
Leucina	89	118	95
Lisina	66	113	81
Metionina + cisteína	33	52	32
Fenilalanina + tirosina	71	70	111
Treonina	44	84	47

Tabela 2 – Conteúdo de aminoácidos essenciais (mg/g de proteína)

Aminoácido	(conclusão)		
	Leite Humano	Proteínas do soro	Caseína
Triptofano	-	24	16
Valina	49	72	75
Total	-	609	511

Fonte: Pinto (2010)

Ainda que o soro possua vantajosas propriedades nutricionais, seu processamento é dispendioso para pequenas e médias empresas de laticínios, que ignoram seu alto valor agregado e, muitas vezes, optam por direcioná-lo para a alimentação animal. Seu excedente acaba sendo descartado como efluente nos cursos de água, sem ser tratado da maneira correta, o que promoveria a redução ou eliminação total dos riscos ambientais que este resíduo, de alta carga orgânica, pode oferecer ao ecossistema local. Estas pequenas e médias empresas da indústria láctea não disponibilizam dados de produção deste subproduto, portanto, é difícil mensurar quanto resíduo é de fato descartado como efluente e quanto é direcionado para a alimentação pecuária (SILVA et al., 2013). Contudo, é possível mensurar, moderadamente, o impacto, conhecendo-se sua composição genérica. Na tabela 3, estão apresentados alguns dos componentes do processamento do queijo, tanto no leite bruto como no soro residual.

Tabela 3 – Composição genérica do leite bovino e do soro

Componentes	Concentração no leite (% m/v)	Concentração no soro (% m/v)
Caseína	2,8	0,2
Proteínas	3,7	0,9
Gordura	3,7	0,4
Cinzas	0,7	0,7
Lactose	4,9	4,9
Sólidos Totais	12,8	6,4
Umidade	87,2	93,5

Fonte: Smithers et al. (1996)

A carga orgânica do soro, bem como o volume gerado, depende diretamente da escala de produção e do tipo de queijo produzido, ainda que a produção de 1 kg

de queijo gere, em média, 9 kg de soro (BRASIL, 2005). Sabe-se que, independentemente da qualidade e origem do soro, este possui características altamente poluentes, uma vez que possui 55% dos nutrientes do leite e, portanto, elevada carga orgânica. Segundo Vera (2017 apud Yadav et al., 2015), a Demanda Bioquímica de Oxigênio de um litro de soro apresenta valores entre 27 e 60 g/L, enquanto a Demanda Química de Oxigênio está entre 50 e 102 g/L, o que requer o oxigênio equivalente a mais de 5.000 litros de água para despoluí-lo.

Em contraste com o fim dado ao soro por estas empresas de médio porte, o setor alimentício e de suplementos alimentares brasileiros importa soro de leite para concentração e secagem do soro de leite em pó ou então em sua forma líquida para fabricação de bebidas lácteas. Um exemplo é o *whey protein*, atualmente um dos produtos mais difundidos entre consumidores que praticam atividade física, que utiliza soro do leite em sua produção e gera efeitos funcionais benéficos à saúde (REGHELM, 2018; SILVA et al., 2013).

Assim, este é um mercado em ascensão, e o Brasil possui a matéria-prima para atender a demanda interna, mas ainda é preciso remanejar e integrar as empresas produtoras de queijo com a área industrial que se beneficia deste soro como matéria-prima. Este viés no mercado interno rebaixa tal subproduto a um resíduo agroindustrial de baixo valor comercial e, neste sentido, faz-se importante a busca por novas alternativas de utilização e aplicação.

Pesquisas utilizando soro de queijo para elaborar meios de cultura experimentais são atualmente produzidas com resultados positivos para crescimento de diferentes micro-organismos. Costa et al. (2012) avaliaram a eficiência do crescimento de *Staphylococcus aureus* em diferentes meios líquidos e sólidos utilizando soro do queijo como substrato fermentativo suplementado com outros nutrientes.

Hassemer (2016) utilizou permeado de soro de leite como fonte de carbono alternativa em meio mineral com adição de alguns nutrientes para produzir o biopolímero P(3HB) a partir de *Bacillus megaterium*. Vera (2017) avaliou a produção de biosurfactante utilizando, entre outros resíduos agroindustriais, o soro do leite através da bactéria *Lactococcus lactis*.

Os resultados obtidos nestes estudos indicam o soro do queijo como substrato em potencial como fonte de carbono em meios adaptados para produção de diferentes bioprodutos de interesse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção, serão apresentados os materiais utilizados e os métodos empregados no desenvolvimento deste trabalho.

4.1 MICRO-ORGANISMOS

Dois micro-organismos foram incluídos neste estudo: *Bacillus amyloliquefaciens* P5 isolado de puba de mandioca – um produto alimentício obtido por meio da fermentação espontânea de raízes de mandioca submersas em água no estado do Sergipe – e *Bacillus megaterium* DSMZ 32, que foi gentilmente cedida pelo Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Esta última cepa foi mantida em placa com meio Luria Bertani (LB), sob refrigeração de 4 °C, até sua utilização.

Ambas espécies de *Bacillus* foram mantidas também em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco Lab. Inc., Detroit, EUA), todos acrescidos de glicerol 15% (v/v) a temperatura de -20 °C. As culturas de trabalho foram obtidas por meio da reativação das amostras congeladas em caldo BHI, incubadas a 24 h por 37 °C, seguido de plaqueamento em meio BHI sólido. As placas foram mantidas em geladeira e reativadas por meio de transferência para meios novos para a produção dos pré-inóculos e inóculos.

4.2 DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO CSQ

O meio de cultivo denominado Caldo Soro de Queijo (CSQ) foi produzido através da adaptação de duas metodologias propostas por Costa (2012) e Hassemer (2016). Para isto, 3 litros de soro bruto foram obtidos de uma produção em pequena escala no interior do município de Triunfo/RS, e o mesmo foi tratado após 48 h de repouso sob refrigeração a 4 °C. O início do tratamento se deu com o descarte do sobrenadante e ajuste do pH de 6,50 para 4,56 utilizando HCl 1 M, com objetivo de tornar o líquido mais límpido. Em seguida, foi efetuada fervura do soro por 14 min, o que possibilitou a precipitação de proteínas como a caseína e outros sólidos solúveis. O concentrado

foi então filtrado a vácuo e denominado de soro tratado. Para a formulação do meio de cultivo utilizou-se o meio mineral que possui a composição descrita na tabela 4 abaixo em conjunto com o soro tratado.

Tabela 4 – Composição do meio mineral

Composto	Concentração
Na ₂ HPO ₄	3,6 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g/L
Ácido Cítrico	0,1 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,008 g/L
Solução de micronutrientes	1 ml/L

Fonte: Hassemer, 2016

A solução de micronutrientes possui uma composição definida, como apresentado na tabela 5:

Tabela 5 – Composição da solução de micronutrientes

Composto	Concentração
H ₃ BO ₃	300 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30 mg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	30 mg/L
NiSO ₄ ·7H ₂ O	30 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10 mg/L

Fonte: Hassemer, 2016

Após a formulação do meio mineral, adicionou-se, para cada litro deste, 25 ml de soro tratado. Além disso, o meio mineral foi suplementado também com uma fonte de nitrogênio, visto que o soro por si só é pobre neste nutriente. A fonte de nitrogênio escolhida foi o nitrogênio orgânico presente no extrato de levedura. Este composto foi adicionado ao meio com a relação de 1% (v/v). Da mesma forma, adicionou-se glicose 1,5% (v/v) (HASSEMER, 2016; PRAZERES et al., 2012).

O soro tratado em conjunto com o meio mineral, extrato de levedura 1% e a glicose 1,5% foi então denominado Caldo Soro de Queijo (CSQ), o qual foi autoclavado a 121 °C por 15 min. Sua composição é mostrada a seguir:

Tabela 6 – Composição do Caldo Soro de Queijo (CSQ)

Composto	Quantidade
Meio Mineral	1 L
Soro Tratado	25 ml
Extrato de Levedura 1%	10 g
Glicose 1,5%	15 g

Fonte: Autor (2019)

4.3 CONDIÇÕES DOS CULTIVOS

Para os cultivos do pré-inóculo de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e de *Bacillus megaterium* DSMZ 32 foram utilizados 20 ml de meio teste CSQ em Erlenmeyer de 125 ml. Da mesma forma, 20 ml de cultivo-controle, para fins de comparação ao CSQ, foram adicionados em Erlenmeyer de 125 ml, tendo sido escolhido como controle o meio comercial *Brain Heart Infusion* (BHI). No total, foram estabelecidos quatro cultivos:

a) Cultivo 1: Caldo Soro de Queijo com cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 (CSQ-P5);

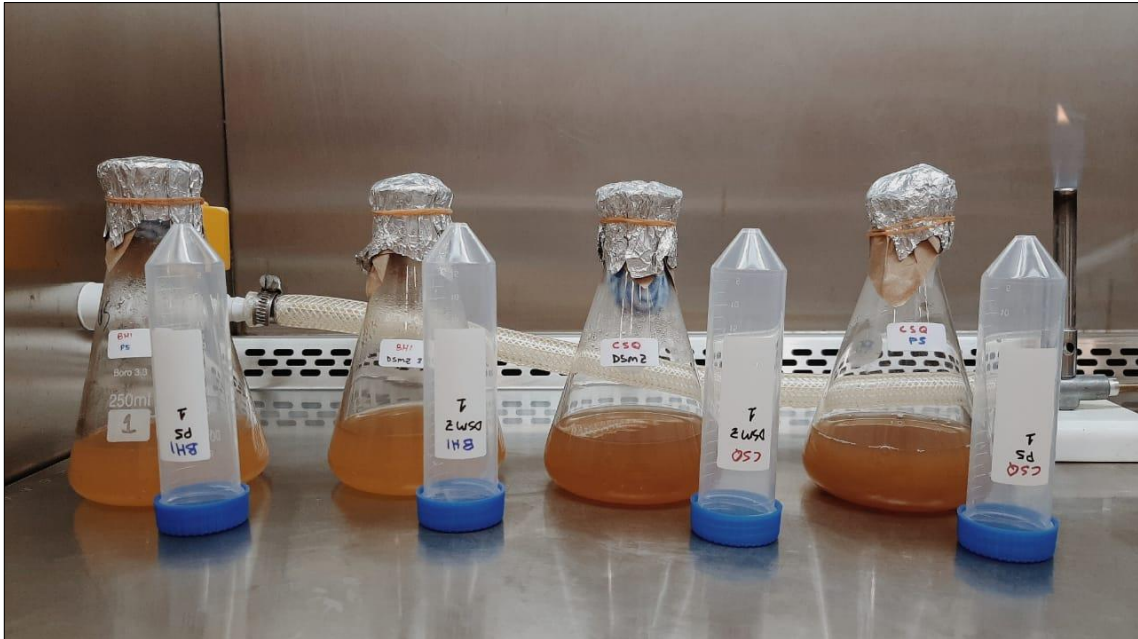
b) Cultivo 2: Caldo Soro de Queijo com cultivo de *Bacillus megaterium* DSMZ 32 (CSQ-DSMZ 32);

c) Cultivo 3: Caldo *Brain Heart Infusion* com cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 (BHI-P5);

d) Cultivo 4: Caldo *Brain Heart Infusion* com cultivo de *Bacillus megaterium* DSMZ 32 (BHI-DSMZ 32).

Os ensaios dos quatro cultivos foram realizados em triplicata. Abaixo, está ilustrado na figura 7 uma amostra representante de cada cultivo.

Figura 7 – Dois Cultivos com meio teste CSQ e dois Cultivos controle BHI



Fonte: Autor (2019)

4.3.1 Preparação do Pré-inóculo

As colônias dos micro-organismos produtores foram reativadas em BHI sólido e coletadas por raspagem, sendo transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml de caldo BHI. A cultura com o pré-inóculo foi incubada por 24 h em diferentes condições de temperatura, conforme descrito abaixo, em estufa rotatória (Solar SL – 223) com rotação de 120 rpm. Após este período, os subcultivos foram padronizados por diluição em solução salina 0,9%, e a concentração de células foi quantificada por densidade óptica em espectrofotômetro da marca PerkinElmer modelo Lambda 265, com comprimento de onda ajustado em 600 nm, de modo que, as diluições foram realizadas até valores de absorbância aproximados de 0,1, correspondendo a 10^8 UFC·ml⁻¹.

Após a padronização, alíquotas de 10 ml foram transferidas para Erlenmeyers de 250 ml contendo 90 ml de meio de cultivo, obtendo-se assim, os inóculos de 10% (v/v) em relação ao pré-inóculo. Estes inóculos permaneceram em estufa rotatória a 120 rpm por 24 h com temperaturas que variaram conforme tabela 7, em três condições estabelecidas para cultivo do pré-inóculo e inóculo.

Tabela 7 – Temperatura dos cultivos dos pré-inóculos e dos inóculos

Condição	Pré-inóculos	Inóculos
1	30 °C	30 °C
2	30 °C	42 °C
3	37 °C	42 °C

Fonte: Adaptado de Perez (2014)

Após, o meio foi centrifugado (Nova Técnica – NT 810) por 30 min a 3300 rpm (2073g). Os sobrenadantes livres de células foram então divididos em dois grupos, sendo um armazenado sob refrigeração para análises posteriores, e o segundo grupo foi filtrado com filtro 0,22 µm (Kasvi). Todos os testes foram executados em triplicata.

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Nesta seção, serão abordadas as análises utilizadas para investigar a produção de biossurfactantes pelas cepas utilizadas nos dois meios de cultivo definidos.

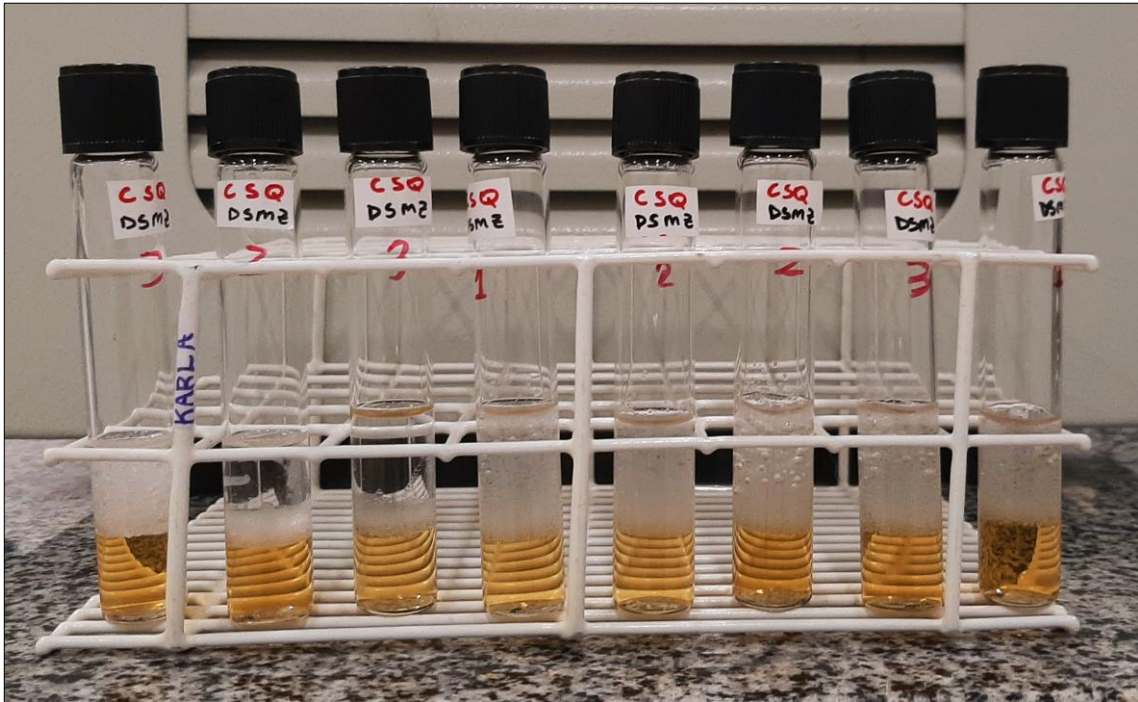
4.4.1 Índice de Emulsificação (E₂₄)

Uma amostra de 2 ml da cultura livre de células foi adicionada a um tubo de ensaio de fundo chato contendo 3 ml de um hidrocarboneto específico. Para este teste, foram utilizados os solventes orgânicos Éter de Petróleo PA ACS (Dinâmica), Hexano PA ACS (Anidrol) e Tolueno PA ACS (Anidrol). Os tubos contendo o sobrenadante livre de células e solvente passaram por homogeneização em vórtex (VX-38) por 2 min e então foram deixados em repouso por 24 h à temperatura ambiente. O Índice de Emulsificação E₂₄ foi então mensurado através da altura da camada emulsificada (mm) dividida pela altura total da coluna líquida (mm), como demonstra a equação abaixo:

$$EI = \frac{He}{Ht} \times 100\%$$

Onde: He e Ht são a altura de emulsificação e a altura total, respectivamente. As análises foram executadas em triplicata para cada um dos diferentes hidrocarbonetos utilizados.

Figura 8 – Emulsões obtidas com sobrenadante de *Bacillus megaterium* DSMZ 32 em meio CSQ, possuindo Hexano e Éter de Petróleo como as fases orgânicas



Fonte: Autor (2019)

4.4.2 Análise Tensiométrica

A redução da tensão superficial no meio de cultura foi medida através do tensiômetro (Gibertini – TSD), no laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Como padrões, utilizou-se a água destilada ($71,6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) e etanol ($23 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$).

As medições foram efetuadas à temperatura ambiente após aprofundar a lamínula-sensor do tensiômetro na solução de sobrenadante da cultura por tempo suficiente para serem alcançadas as condições de equilíbrio. A tensão superficial dos meios de cultivo puro foi previamente mensurada e seus valores foram utilizados para comparação com os valores das amostras. A medição da tensão nas amostras foi feita em triplicata e o valor médio foi tomado para expressar cada tensão superficial (HIDAYATI, 2011).

4.4.3 Atividade Hemolítica

Para a verificação da atividade hemolítica foi utilizado o método de Hsieh et al. (2004) com modificações. Para este teste, inoculou-se células bacterianas crescidas em meio CSQ e BHI e também os sobrenadantes centrifugados e filtrados a 0,22 μm sobre a superfície de placas de ágar Mueller Hinton acrescidas de 5% de sangue de carneiro e incubou-se a 37 °C, por até 48 h. A presença de zona clara com 2 a 4 mm em torno da colônia indica hemólise que, por sua vez, indica a produção de um biossurfactante, apesar de esta ser uma medida indireta.

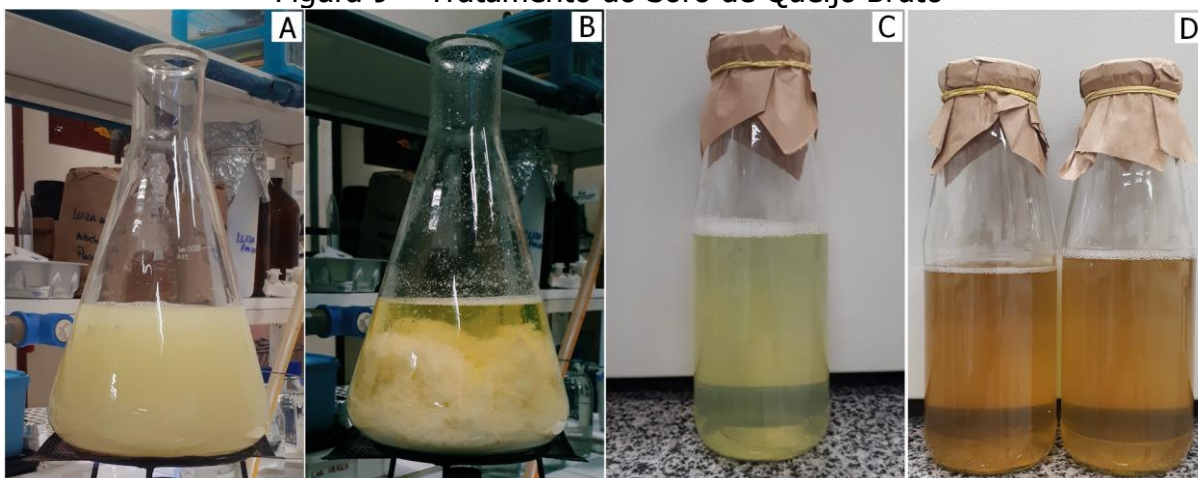
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, estão apresentados os resultados obtidos e as considerações competentes.

5.1 DESENVOLVIMENTO DO MEIO DE CULTIVO CALDO SORO DE QUEIJO (CSQ)

Neste trabalho, foi desenvolvido o meio de cultivo CSQ a partir do soro de queijo oriundo de uma pequena indústria localizada no município de Triunfo, estado do Rio Grande do Sul. Para o desenvolvimento do meio de cultivo teste, inicialmente foram tratados 3 litros de soro bruto, que consistiu no descarte do sobrenadante e posterior ajuste do pH para 4,5, o que gerou uma alteração da coloração de amarelo-esverdeada para um tom mais esbranquiçado do soro (figura 9 A).

Figura 9 – Tratamento do Soro de Queijo Bruto



Fonte: Autor (2019)

Posteriormente, efetuou-se então a fervura do soro por 14 minutos, que precipitou as proteínas como a caseína e outros sólidos solúveis, tornando o soro mais límpido (figura 9 B). O concentrado foi então filtrado a vácuo e denominado de soro tratado (figura 9 C). Para a formulação do meio de cultivo, utilizou-se o meio mineral descrito anteriormente na metodologia em conjunto com o soro tratado. Foi acrescentada a solução de micronutrientes, anteriormente testada e otimizada em outros estudos. Como relatado por Hassemer (2016), há para este meio a necessidade de suplementação com fonte de nitrogênio e micronutrientes. Extrato de levedura 1%

é adicionado para prover esta deficiência, bem como a adição de glicose 1% (figura 9 D). Este mesmo autor utilizou o permeado de soro que é oriundo da ultrafiltração do soro de leite, em que as proteínas solúveis são removidas do soro, dando origem ao permeado rico em lactose para produzir P(3HB) pelo mesmo micro-organismo *B. megaterium* DSMZ 32 utilizado no presente estudo – reduzindo os custos de tratamento do permeado de soro bem como os impactos ambientais causados pelo descarte do mesmo e ainda auxiliando na redução do custo de obtenção do P(3HB) pelo mesmo bacilo.

Outros trabalhos também utilizaram soro do queijo como meio de cultivo para a obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus* e de biosurfactantes, de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 e como meio de cultura para o crescimento de *Staphylococcus aureus* como forma de reaproveitamento deste subproduto da indústria cujo destinação final seria o descarte (LOURENCINI, 2014; MANSUR, 2006; COSTA et al., 2012).

5.2 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (E₂₄)

Os resultados obtidos das emulsificações nas três condições de cultivo especificadas estão apresentados nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8 – Índices de Emulsificação médios da condição de cultivo 1

Cultivo	Média E₂₄ (%) Hexano	Média E₂₄ (%) Tolueno	Média E₂₄ (%) Éter de Petróleo
CSQ – P5	0	5,8	0
CSQ – DSMZ 32	51,8	30,4	67,3
BHI – P5	2,6	3,3	0
BHI – DSMZ 32	2,9	6,2	0

Fonte: Autor (2019)

Tabela 9 – Índices de Emulsificação médios da condição de cultivo 2

Cultivo	Média E ₂₄ (%)	Média E ₂₄ (%)	Média E ₂₄ (%)
	Hexano	Tolueno	Éter de Petróleo
CSQ – P5	42,4	9,5	55,9
CSQ – DSMZ 32	54,0	15,1	59,1
BHI – P5	0	0	0
BHI – DSMZ 32	33,1	10,9	40,0

Fonte: Autor (2019)

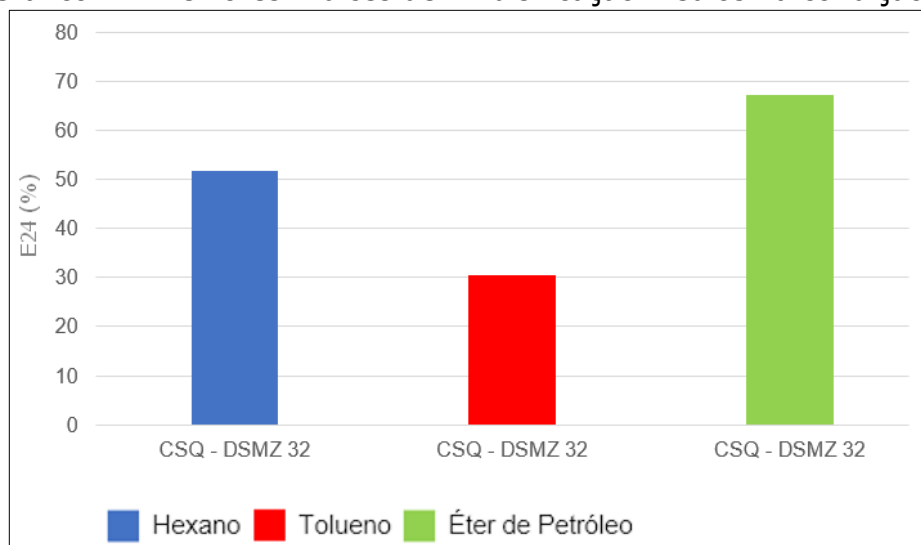
Tabela 10 – Índices de Emulsificação médios da condição de cultivo 3

Cultivo	Média E ₂₄ (%)	Média E ₂₄ (%)	Média E ₂₄ (%)
	Hexano	Tolueno	Éter de Petróleo
CSQ – P5	61,1	12,1	43,1
CSQ – DSMZ 32	53,3	31,4	52,8
BHI – P5	51,9	0	0
BHI – DSMZ 32	10,3	17,6	38,9

Fonte: Autor (2019)

Na condição 1, o pré-inóculo e o inóculo foram cultivados por 24 h a 30 °C. Os índices de emulsificação obtidos foram satisfatórios apenas para o cultivo de *B. megaterium* DSMZ 32 em meio teste CSQ, uma vez que estes apresentaram índices acima de 15%, como apresentado no gráfico 1.

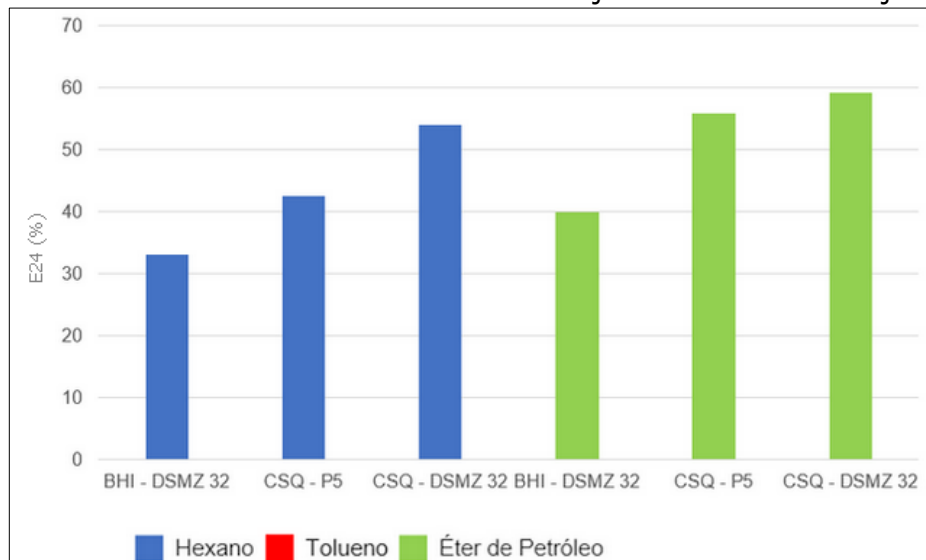
Gráfico 1 – Melhores Índices de Emulsificação médios na condição 1



Fonte: Autor (2019)

Na segunda condição (gráfico 2), os pré-inóculos foram submetidos à temperatura de 30 °C, e os inóculos a 42 °C, pois, de acordo com estudos anteriores (Perez et al., 2017), foi observado um aumento na produção destes compostos quando a temperatura era aumentada para o crescimento do inóculo para 42 °C. Assim, neste estudo, observou-se um aumento na emulsificação no meio teste CSQ livre de células do micro-organismo *B. amyloliquefaciens* P5, bem como um aumento também representativo da emulsificação no meio teste BHI de *B. megaterium* DSMZ 32. Os resultados para a cepa P5 em meio BHI, no entanto, foram nulos. Este aumento na emulsificação da maioria das condições pode ter sido resultado do incremento da temperatura do inóculo, o que aumentou a produção de biossurfactante e, conseqüentemente, a emulsão.

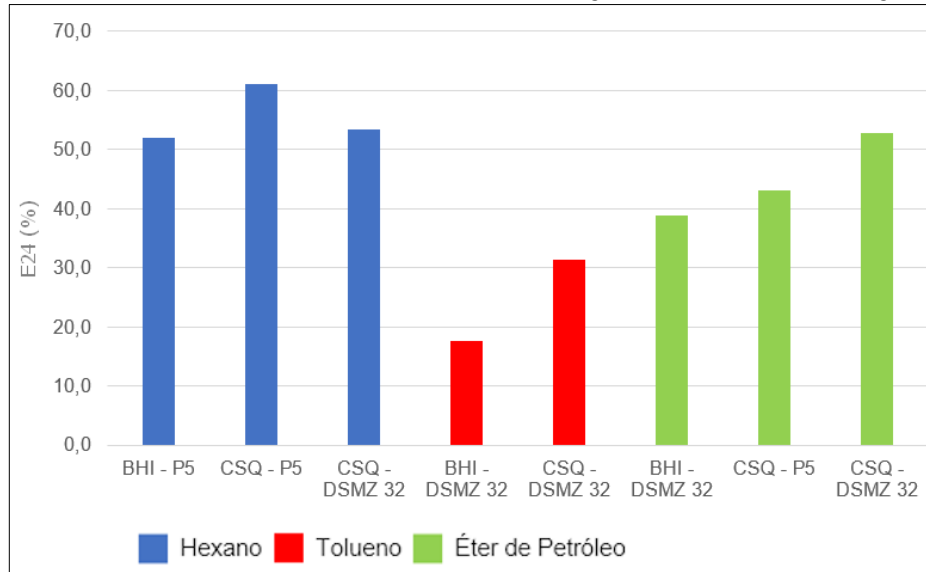
Gráfico 2 – Melhores Índices de Emulsificação médios na condição 2



Fonte: Autor (2019)

Na última condição (gráfico 3), os pré-inóculos foram cultivados em temperaturas mais elevadas de 37 °C, enquanto os inóculos se desenvolveram por 24 h a 42 °C. Houve um maior índice de emulsificação nestas amostras, ainda que os solventes Tolueno e Éter de Petróleo tenham mantido seu índice emulsificação zero com a cepa *B. amyloliquefaciens* P5 em meio BHI.

Gráfico 3 – Melhores Índices de Emulsificação médios na condição 3



Fonte: Autor (2019)

Considerando todas as condições de cultivo realizadas durante este trabalho, o micro-organismo *B. amyloliquefaciens* P5 apresentou os menores índices de emulsificação, tanto em meio teste, quanto no meio controle – não tendo apresentado nenhuma emulsificação no meio BHI, independente da condição de cultivo. Seu melhor desempenho foi em meio CSQ na condição de cultivo 3 (incubação em temperatura de 37 °C e 42 °C do pré-inóculo e do inóculo, respectivamente), utilizando-se o solvente orgânico Hexano, o que gerou um índice de emulsificação médio de 61,1%. Com o solvente Éter de Petróleo, a cepa *B. amyloliquefaciens* P5 também mostrou elevado índice de emulsificação (55,9%) na condição de cultivo 2. O mesmo desempenho não foi observado com o solvente Tolueno, apresentando índices de emulsificação de até 12% nas três condições de cultivo.

O *B. megaterium* DSMZ 32 cultivado no meio teste CSQ apresentou resultados satisfatórios nos índices e estabilidade das emulsificações com todos os hidrocarbonetos testados, em todas as condições de cultivo. Apresentando 67,3% de emulsificação com Éter de Petróleo na condição 1 de cultivo, 54% de emulsificação com Hexano na condição 2, e 31,4% com Tolueno na condição 3. Estes índices mantiveram-se próximos nas diferentes condições de cultivo, indicando pouca ou nenhuma influência desta faixa de variação de temperatura na produção de biossurfactante por esta bactéria. Em relação aos cultivos em meio controle BHI, na

condição 1, as emulsificações apresentaram os menores índices, representando que a temperatura de 30 °C para o pré-inóculo e para o inóculo pode ser baixa para a produção de biossurfactantes com esta cepa, resultados que reproduzem o já observado em estudos anteriores também para a cepa *B. amyloliquefaciens* P5 (PEREZ, 2014; PEREZ et al., 2017).

Outros parâmetros, no entanto, devem ser também considerados além da temperatura. Segundo Yalçin (2018), o tamanho da cadeia hidrocarbonada do solvente escolhida afeta o nível de emulsificação, de modo que a formação de emulsão decresce com a adição do biossurfactante com hidrocarbonetos alifáticos de cadeias mais longas. Esta afirmação condiz com os resultados de E₂₄ superiores com solvente Éter de Petróleo quando em comparação com os outros dois solventes. Assim, em vias gerais, pode-se afirmar que os micro-organismos testados apresentaram uma melhor eficiência em emulsionar as amostras que continham Éter de Petróleo primeiramente, Hexano posteriormente e, por fim, as que continham Tolueno.

Para Cooper e Goldenberger (1987), índices de emulsificação acima de 50% são considerados altos. Desta forma, o meio testado CSQ que foi desenvolvido apresentou ótimos resultados com *Bacillus megaterium* DSMZ 32 em emulsão com os solventes Hexano e Éter de Petróleo em todas as condições de cultivo testadas, e resultados satisfatórios com emulsão em Tolueno nas condições 1 e 3 (30,4% e 31,4%, respectivamente). O meio teste CSQ utilizado para crescimento de *B. amyloliquefaciens* P5, por sua vez, apresentou resultados insatisfatórios na condição de temperatura 1 (30 °C para pré-inóculo e inóculo). Seu desempenho foi melhorando na condição 2, resultando em índices de 42,4% para o Hexano e 55,9% para a emulsificação de Éter de Petróleo. Já na última condição, o índice de emulsificação com Hexano chegou a 61,1%, a emulsão com Tolueno melhorou levemente até índice de 12,1%, e com Éter de Petróleo reduziu para 43,1%.

Os índices de emulsificação médios obtidos após as três condições de cultivo dos dois micro-organismos testados são favoráveis e permitem afirmar que a produção de biossurfactante por ambas as cepas foi considerável, ainda que as condições de cultivo devam ser aprimoradas para cada um dos micro-organismos com fins de aumentar a produção de biossurfactante e melhorar reprodutibilidade dos ensaios.

5.3 ANÁLISE TENSIOMÉTRICA

Os meios de cultivo-teste CSQ e meio controle BHI foram avaliados em sua composição pura (sem inoculação de crescimento microbiano) para fins de comparação com os meios após crescimento e produção de biossurfactante pelos dois micro-organismos estudados. Estes apresentaram valores de tensão superficial de 49,7 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ e 50,3 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$, respectivamente. Os resultados da avaliação da tensão superficial das amostras são mostrados nas tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11 – Análises Tensiométricas Médias da condição 1

Cultivo	Tensão Superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
CSQ – P5	30,3
CSQ – DSMZ 32	42,7
BHI – P5	40,5
BHI – DSMZ 32	50,9

Fonte: Autor (2019)

Tabela 12 – Análises Tensiométricas Médias da condição 2

Cultivo	Tensão Superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
CSQ – P5	46,1
CSQ – DSMZ 32	47,8
BHI – P5	46,2
BHI – DSMZ 32	46,4

Fonte: Autor (2019)

Tabela 13 – Análises Tensiométricas Médias da condição 3

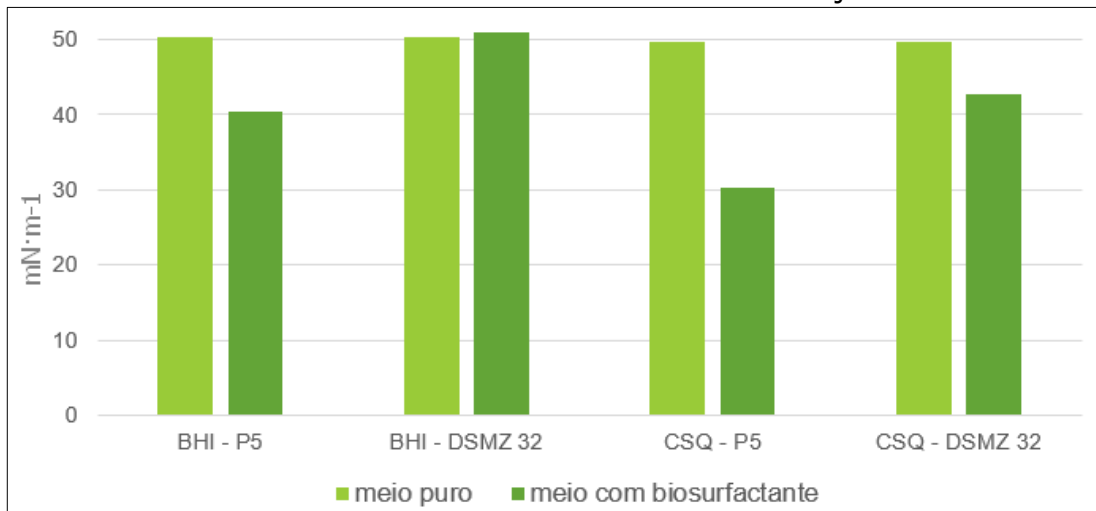
Cultivo	Tensão Superficial ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$)
CSQ – P5	48,4
CSQ – DSMZ 32	52,9
BHI – P5	50,1
BHI – DSMZ 32	48,7

Fonte: Autor (2019)

As reduções na tensão superficial das amostras foram discretas em relação aos meios de cultivo puro. De modo que os melhores resultados ocorreram para *Bacillus amyloliquefaciens* P5 em meio CSQ (30,3 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) correspondendo a uma redução de 39% da tensão superficial e para o mesmo micro-organismo em meio teste BHI,

reduzindo a tensão de $50,3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $40,47 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, o que caracteriza uma redução de 19,5%. As maiores reduções supracitadas ocorreram em meios cultivados na condição 1, isto é, temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ para o pré-inóculo e para o inóculo.

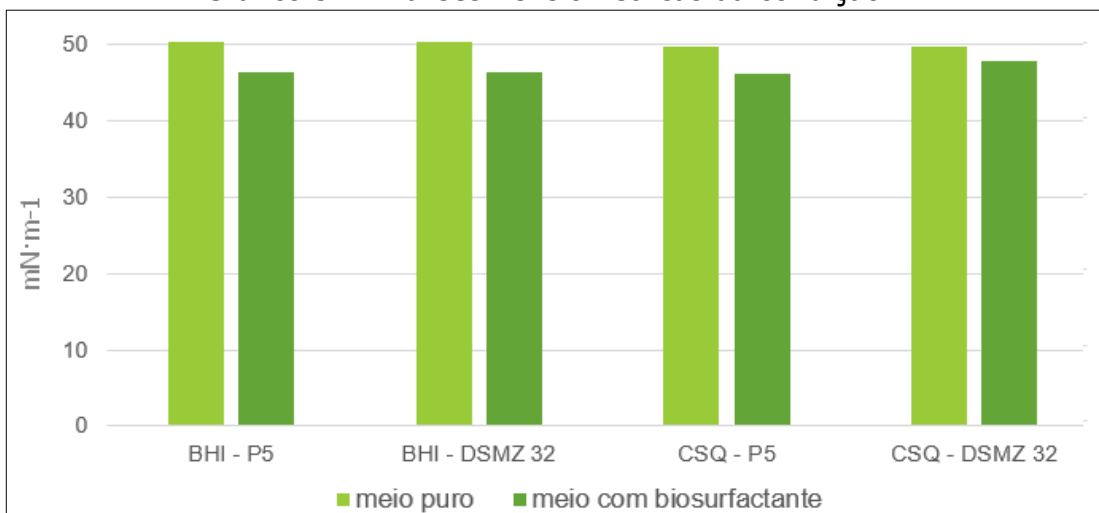
Gráfico 4 – Análises Tensiométricas da condição 1



Fonte: Autor (2019)

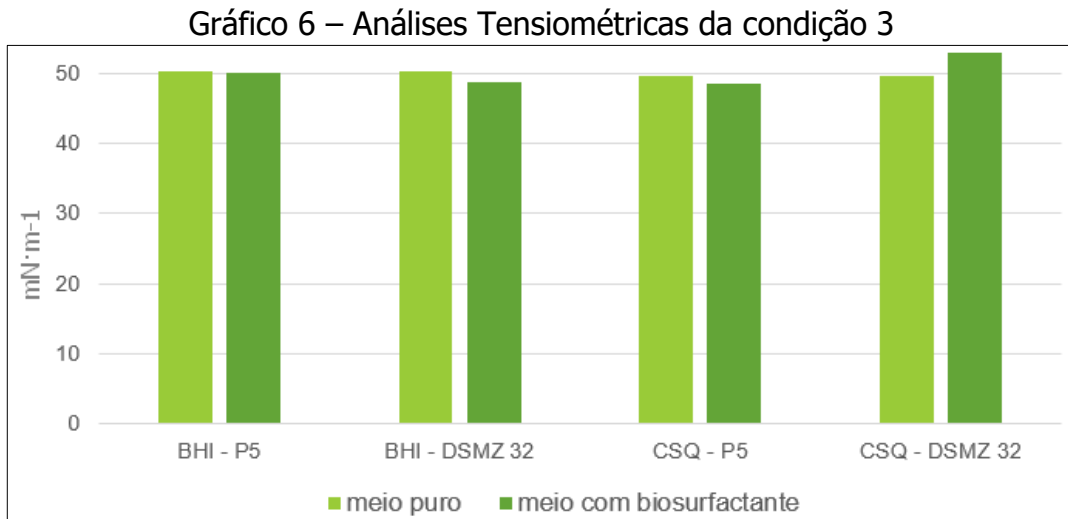
As tensões superficiais das condições de cultivo 2 e 3 (gráficos 5 e 6, respectivamente) não demonstraram redução efetiva para nenhum dos cultivos teste ou controle, o que pode indicar que a produção de biosurfactante tensoativo não é dependente deste parâmetro nesta faixa de variação.

Gráfico 5 – Análises Tensiométricas da condição 2



Fonte: Autor (2019)

Na condição de cultivo 3 (gráfico 6), a amostra de *B. megaterium* DSMZ 32 em meio CSQ demonstrou leve aumento na tensão superficial, contrariando o comportamento esperado.



Fonte: Autor (2019)

Os dados mostram a redução da tensão superficial no sobrenadante livre de células para a maioria das amostras, exceto para *B. amyloliquefaciens* P5 em meio BHI na condição de cultivo 1 e *B. megaterium* DSMZ 32 em meio CSQ na condição de cultivo 3.

Para Ayed et al. (2014), um micro-organismo pode ser considerado promissor na produção de biossurfactante se for possível diminuir a tensão superficial da água para valores menores que 40 mN·m⁻¹, o que equivale a uma redução de 44,5% da tensão superficial da água pura (72 mN·m⁻¹). Nenhum dos meios de cultivo avaliados reduziu de tal forma sua tensão superficial após o cultivo, independente das condições testadas ou dos micro-organismos utilizados.

Assim, estes resultados, ainda que insatisfatórios do ponto de vista analítico, consideraram apenas a capacidade tensoativa dos biossurfactantes e não avaliam o potencial emulsificante presente também nestas moléculas. Eles indicam que a atividade superficial destas moléculas não é eficaz ou não houve rendimento suficiente na produção das mesmas, possibilitando obter uma concentração suficiente para haver mudança notável neste parâmetro. Por este motivo, outras análises deverão ser feitas em conjunto para a avaliação mais ampla da produção destes surfactantes

microbiológicos pelos micro-organismos em questão. Logo, os resultados de redução da tensão superficial, ainda que discretos apontam a presença de biomoléculas tensoativas, capazes de exercer tal efeito.

É preciso considerar todos os parâmetros, como relatado por Ayed et al. (2014). A morfologia do biossurfactante é dependente do pH e pode ser alterada de lamelar para vesicular e por fim para a configuração micelar conforme o pH vai se tornando alcalino. O pH mais ácido pode resultar na precipitação do biossurfactante e, conseqüente, diminuição na sua eficiência. Medidas de pH não foram efetuadas nas amostras após o cultivo, de modo que não é possível afirmar que a neutralidade se manteve.

Ainda que exista uma relação entre a tensão superficial e a temperatura – devido à diminuição das forças coesivas com o aumento da atividade térmica molecular – todas as amostras foram mantidas sob a mesma refrigeração até o dia da análise, de modo que, se houve alteração da tensão por influência da temperatura, este seria um parâmetro observado em todas as amostras e a porcentagem de redução se manteria inalterada (FLORIDA, 2019).

5.4 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os resultados das análises em placas de ágar sangue, para observação da presença de atividade hemolítica foram positivos para todos os cultivos testados após 48 h de incubação. Os testes foram realizados com os dois meios de cultivo utilizados livres de células e com os meios de cultivo ainda com células (sem centrifugação). Todas as placas apresentaram lise de eritrócitos do sangue como mostrado na figura 10, o que indica a presença de biossurfactante. Os resultados deste teste para *B. amyloliquefaciens* P5 também foram condizentes com estudos anteriormente realizados com este mesmo micro-organismo, demonstrando a presença de hemólise das hemácias em ágar sangue (PEREZ, 2014; PEREZ et al., 2017).

Figura 10 – Atividade hemolítica positiva do inóculo de *Bacillus amyloliquefaciens* P5 cultivada em meio CSQ



Fonte: Autor (2019)

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estudada a produção de biossurfactante por *Bacillus amyloliquefaciens* P5 e *Bacillus megaterium* DSMZ 32 a partir da formulação de um meio de cultivo utilizando soro de queijo tratado como fonte de carbono, variando a temperatura do pré-inóculo e do inóculo para avaliação da melhor condição de crescimento e produção do bioproduto de interesse.

O conjunto de análises para avaliação da produção de biossurfactante mostrou resultados positivos para o crescimento dos micro-organismos e produção destas moléculas no meio teste Caldo Soro de Queijo (CSQ), bem como no meio de cultivo controle *Brain Heart Infusion* (BHI). Os maiores Índices de Emulsificação, correspondentes à maior quantidade de biossurfactante, foram obtidos nos cultivos com condições mais elevadas de temperatura do pré-inóculo e do inóculo (condições 2 e 3), o que sugere que temperaturas mais altas favorecem a produção desta molécula. Dentre os melhores resultados, o meio CSQ com *B. megaterium* DSMZ 32, produziu emulsificação média de 67,3% com Éter de Petróleo, enquanto que *B. amyloliquefaciens* P5 neste mesmo meio apresentou 61,1% de emulsificação média do Hexano.

As Análises Tensiométricas mostraram um padrão de redução discreto na tensão superficial da maioria das amostras, o que é um indicativo da presença de biossurfactante, ainda que em pouca quantidade. As maiores reduções da tensão superficial foram obtidas com *B. amyloliquefaciens* P5 em meio CSQ, gerando uma redução de 39% da tensão e em meio teste BHI, com 19,5% de redução. Esse resultado agrega valor e possibilidades de uso futuro deste substrato como meio de cultivo para a produção destes compostos, uma vez que os resultados foram melhores neste meio de cultivo quando comparados ao meio comercial BHI que é mais oneroso.

A Atividade Hemolítica dos sobrenadantes e do meio contendo células apresentou resultados confirmativos de hemólise para todas as amostras, o que reforça a presença de biossurfactante nos meios de cultivos utilizados.

Desta forma, é possível concluir que houve produção de biossurfactante pelos dois micro-organismos testados *B. amyloliquefaciens* P5 e *B. megaterium* DSMZ 32 a partir do meio Caldo Soro de Queijo. Os melhores resultados foram obtidos com *B.*

megaterium DSMZ 32, que apresentou elevado desempenho de emulsificação nas três condições de cultivo testadas e com os três solventes orgânicos utilizados.

Como perspectivas do estudo, é possível otimizar os parâmetros de temperatura para aumento do rendimento de produção destas biomoléculas, variando também outros parâmetros como aeração e agitação. Realizar outras análises para avaliação da produção de biossurfactante como atividade antiadesiva e antimicrobiana. E, futuramente, purificar, isolar e caracterizar este composto quimicamente.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Fábio. **Tensão Superficial**. Disponível em: <<http://fisicacomentada.blogspot.com/2013/01/tensao-superficial.html>> Acesso em: 16 mar. 2019.

ATKINS, P. W; DE PAULA, J. Materiais 1: Macromoléculas e Agregados. In: _____. **Físico-Química**. vol. 2, 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. p. 224-230.

AYED, H. B. et al. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* AN6. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Tunisia, v. 99, p. 8-14, 2015.

BANAT, I.M., DE RIENZO, M.A.D. & QUINN, G.A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 98, p. 9915-9929, 2014.

BARON, S. **Medical Microbiology**. ed. 4, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.4, p. 979-985, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 175, de 16 de maio de 2005. **Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole**. – CGPE/DIPOA. Brasília, DF, 16 mai. 2005.

BUNK, B.; SCHULZ, A.; STAMMEN, S.; MUNCH, R.; WARREN, MJ.; ROHDE, M.; JAHN, D.; BIEDENDIECK, R. A short story about a big magic bug. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 85–91, 2010.

CHANG, Raymond. O Estado Líquido. In: _____. **Físico-Química: Para Ciências Químicas e Biológicas**. vol. 2, 3 ed. Porto Alegre: AMGH, p. 310-312. 2010

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

COSTA, R. A. et al. Uso de soro de leite bovino para elaboração de meios de cultura para *Staphylococcus aureus*. **Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 1, p. 198-201, 2012.

DALTIN, Décio. Introdução e primeiros conceitos. In: _____. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2011. p. 28-35.

EHRHARDT, D. D. **Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato**. 2015. Universidade

Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266046>>. Acesso em: 26 ago. 2018

FAKRUDDIN, M. Biosurfactant: Production and Application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**. v. 3. p. 124. 2012.

FERNANDES, P. A. V. et al. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 704-709, 2007.

GONZÁLEZ SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Elsevier Science Limited**. 1996.

HASSEMER, G. S. **Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* Utilizando Permeado de Soro de Leite**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2016.

HIDAYATI, V. N. et al. Fluorene Removal by Biosurfactants Producing *Bacillus megaterium*. **Waste Biomass Valorization**. v. 2, p. 415-422, 2011.

HSIEH, F. C.; LI, M. C.; LIN, T. C.; KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 186-191, 2004.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their Applications for Soil Bioremediation. **Food Technol Biotechnol** v. 39, p. 295-304, 2001.

KRISHNASWAMY, M. et al. Biosurfactants properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-747, 2008.

KROLOW, Ana Cristina. **Soro de queijo, alimento nutritivo e funcional**. 2013. Disponível em: < <https://www.portaldoagronegocio.com.br/artigo/soro-de-queijo-alimento-nutritivo-e-funcional-3581>>. Acesso em: 16 mar. 2019.

KRONEMBERGER, F.A. Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em Biorreator com Oxigenação por Contactor de Membranas. Rio de Janeiro, 2007.

LOURENCINI, L. S. F. **Uso de soro de leite para obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e de biosurfactante**. São Paulo, 2014.

MANSUR, L. R. C. O. **Utilização de soro de leite para a produção de amilases por *Bacillus* sp. SMIA-2**. Rio de Janeiro, 2006.

MILLER, C. A. **Detergency for engineering applications of surfactant solutions**. In: *Encyclopedia of surface and colloid Science*. Huston: Marcel Dekker, 2002. p. 1379-1384.

MIZUBUTI, I.Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. Semina: Ci. Agr., Londrina, v.15, n.1, p.80-94, março 1994.

MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **Scientia Plena**, Sergipe, v. 8. n.10, p. 1-7, 2012.

MULLIGAN, C.N. **Environmental applications for biosurfactants. Environmental pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

_____. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 14, p. 372-378, 2009.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. v. 25, n.5, p. 772-776, 2002.

NURFARAHIN, A. H.; MOHAMED, M. S.; PHANG, L. Y. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production - An Overview. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**. v. 23 p. 1049, 2018.

PEREZ, K. J. **Caracterização de lipopeptídeos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *Bacillus* spp. Isolados de puba**. Belo Horizonte, 2014.

PEREZ, K. J. et al. *Bacillus* spp. Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, p. 1-14, 2017.

PINTO, F. A. **Metodologia da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros provenientes da fabricação de queijos Minas padrão e prato**. 45 f.- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

PIRÔLLO, M.P.S. et al. **Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site**. Journal of applied microbiology. v. 105, p. 1484-1490. 2008.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v.110, p. 48-68, 2012.

REGHELIM, Mariane; RIGHI, Eléia. **Reaproveitamento de Resíduo: Alternativas para o Soro do Queijo**. 6º Congresso Internacional de Tecnologias para o Meio Ambiente, Bento Gonçalves - RS, 2018.

SALAGER, J. L. **Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas: estado del arte**. In: Cuaderno FIRP S747 Mérida: Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de los Andes, 1999. p. 33-42.

SALIHU, A. et al. An investigation for potential development of biosurfactants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 3, p. 111-117. 2009.

SANTOS, D. K.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 401, p. 31, 2016.

SCHWARTZ, A. M. et al. **Surface active agentes and detergents**. New York: Interscience Publishers, 1985. p. 25-132.

SILVA, R.O.P. et al. Análises e Indicadores do Agronegócio. **Aspectos das Importações de Soro de Leite no Brasil**. Instituto de Economia Agrícola, v. 8, n. 7, 2013.

SMITHERS, G. W. et al. **New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins**. Journal of Dairy Science, v. 79, p. 1454-1459, 1996.

SPEIGHT, J.G. **Environmental Inorganic Chemistry for Engineers**. ed. 1 Oxfordshire: Butterworth-Heinemann, 2017. 592

SUÍÇA, World Health Organization. **Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition**. Genebra, 2002.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p.7, 2007.

UNIVERSITY OF FLORIDA. **Surface Tension**. 2019. Disponível em: <http://fsz.ifas.ufl.edu/surfacetensionandcapillarity/html/en_tension.htm> Acesso em: 08 jul. 2019

VERA, E. C. S. **Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas propriedades**. Universidade de São Paulo, São Paulo. p. 136, 2017.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. **Biosurfactants-Types, Sources and Applications**. Research Journal of Microbiology. v. 10, p. 181-192. 2015.

YALÇIN, H. T. et al. Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. **Journal of Basic Microbiology**. v. 58, p. 782-792. 2018