

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

FELIPE SÁ ESMERALDO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS* LAMI005**

**FORTALEZA
2010**

FELIPE SÁ ESMERALDO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS* LAMI005**

Monografia apresentada à
coordenação do Curso de
Engenharia Química da
Universidade Federal do Ceará
como exigência parcial para
conclusão do curso de bacharel em
Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana
Rocha Barros Gonçalves.

FORTALEZA
2010

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS* LAMI005**

Monografia apresentada à coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará como exigência parcial para conclusão do curso de bacharel em Engenharia Química.

Aprovada em 03, 12, 2010

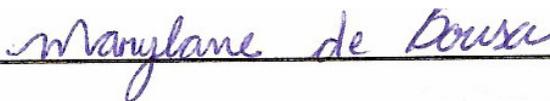
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Vitor M. R. Ponte
Universidade Federal do Ceará – UFC



Marylane de Sousa
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e amor.

À Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela oportunidade e confiança em meu trabalho.

Aos colegas de laboratório do grupo de pesquisa GPBio, em especial à Marylane de Sousa, Iuri Torquato e Ítalo Waldemiro, pela ajuda nos experimentos realizados.

Aos amigos Humberto Gondim, Filipe Xavier, João Felipe, Jeann Diniz, Felipe de Oliveira, Gabriel Sabadia, César Augusto, Julianne Ribeiro, Caroliny Gomes, Regiane Pinheiro, Ticiane Cavalcante e Luciana Limaverde; especialmente aos grandes amigos Daniel David e Cristiano Régis, pela amizade, apoio e convivência nesses cinco anos de curso.

Aos professores do Curso de Engenharia Química da UFC, pela dedicação e contribuição em minha formação acadêmica.

RESUMO

A crescente preocupação com o meio ambiente vem influenciando a pesquisa relacionada à produção de biossurfactantes como uma alternativa aos surfactantes sintéticos derivados do petróleo. Os biossurfactantes, ou surfactantes naturais, apresentam uma série de vantagens em relação aos sintéticos, como: biodegradabilidade, produção a partir de fontes renováveis, baixa toxicidade ao ambiente e funcionalidade sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Porém, algumas desvantagens deontam quando se analisam os aspectos econômicos para produção em larga escala, sendo os processos de recuperação e purificação responsáveis pela maior parte dos custos de produção. Daí a procura por condições otimizadas de produção (matéria-prima de baixo custo, seleção de linhagens altamente produtoras) que possam reduzir os custos e viabilizar a implementação em larga escala. Neste contexto, visando avaliar as condições de produção de surfactina foram realizadas fermentações aeróbias, com duração de 72 horas, em diferentes temperaturas, utilizando o microorganismo *Bacillus subtilis* e glicerol P.A. como principal fonte de substrato. As amostras coletadas foram analisadas por espectrofotometria para determinação de biomassa (g.L^{-1}). Foi utilizado um kit enzimático de triglicérides, capaz de reagir com o glicerol, para avaliar a concentração de substrato (g.L^{-1}) remanescente. A concentração de surfactina foi analisada qualitativamente (tensão superficial e índice de emulsificação) e quantitativamente (CLAE – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho). A maior concentração de biossurfactante, aproximadamente 295 mg.L^{-1} , foi verificada na maior temperatura avaliada.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, surfactina, glicerol P.A., temperatura, cromatografia líquida de alto desempenho.

ABSTRACT

The increasing concern over the environment has influenced research related to the production of biosurfactants as an alternative to synthetic surfactants from oil derivatives. The biosurfactants, or natural surfactants, presents a series of advantages over the synthetic ones, such as: biodegradability, production by renewable resources, low toxicity to the environment and functionality under extreme conditions of pH, temperature and salinity. However, there are some disadvantages when we analyze the economical aspects of large scale production, where processes like recuperation and purification are responsible for a higher cost of production. Whence the quest for optimized production conditions (low cost raw material, selection of highly productive lineages) that may reduce costs and make feasible the large scale application. To evaluate the production conditions of surfactin, aerobic fermentations where conducted for 72 hours at different temperatures, using *Bacillus subtilis* as micro-organism and glycerol P.A. as main carbon source. The collected samples where analyzed in a spectrophotometer to determine the cellular concentration (g.L^{-1}). An enzyme kit of triglycerides, capable to react with glycerol, was used to evaluate the remaining substrate concentration (g.L^{-1}). The surfactin concentration was qualitatively (surface tension and emulsification index) and quantitatively (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) analyzed. The highest biosurfactant concentration, approximately 295mg.L^{-1} , was verified at the highest temperature evaluated.

Key words: *Bacillus subtilis*, surfactin, glycerol P.A., temperature, high performance liquid chromatography.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Exemplo de molécula anfipática.....	3
FIGURA 2	Varição de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante.....	4
FIGURA 3	Células do gênero <i>Bacillus</i>	6
FIGURA 4	Estrutura molecular do glicerol.....	7
FIGURA 5	Estrutura molecular da surfactina.....	8
FIGURA 6	Placa de Petri contendo <i>Bacillus subtilis</i> em Agar nutriente.....	12
FIGURA 7	Inóculo em mesa agitadora.....	14
FIGURA 8	Sistema utilizado para realização das fermentações.....	14
FIGURA 9	Tensiômetro utilizado para análise de tensão superficial.....	15
FIGURA 10	Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC).....	16
FIGURA 11	Análise de glicerol pelo uso de reagente de cor.....	17
FIGURA 12	Emulsões formadas a partir de diferentes fontes hidrofóbicas.....	18
FIGURA 13	Perfil de crescimento celular (-■-), consumo de substrato (-●-) e formação de produto (-▲-) para <i>Bacillus subtilis</i> na temperatura de 28°C.....	21
FIGURA 14	Perfil de crescimento celular (-■-), consumo de substrato (-●-) e formação de produto (-▲-) para <i>Bacillus subtilis</i> na temperatura de 30°C.....	22

FIGURA 15 Perfil de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para <i>Bacillus subtilis</i> na temperatura de 32°C.....	22
FIGURA 16 Material em suspensão presente durante a fermentação de 34°C.....	23
FIGURA 17 Velocidade específica de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para <i>Bacillus subtilis</i> na temperatura de 28°C.....	24
FIGURA 18 Velocidade específica de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para <i>Bacillus subtilis</i> na temperatura de 30°C.....	24
FIGURA 19 Velocidade específica de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para <i>Bacillus subtilis</i> na temperatura de 32°C.....	24
FIGURA 20 Representação gráfica da tensão superficial do meio fermentado livre de células para as diferentes temperaturas estudadas.....	26
FIGURA 21 Resultado da capacidade de emulsificação na fermentação em 34°C.....	28
FIGURA 22 Representação gráfica dos dados experimentais X_{exp} (■), S_{exp} (●) e P_{exp} (▲) e dos valores calculados pelos modelos X_{calc} (—), S_{calc} (—) e P_{calc} (—) em 32°C.....	31
FIGURA 23 Representação gráfica dos dados experimentais X_{exp} (■), S_{exp} (●) e P_{exp} (▲) e dos valores calculados pelos modelos X_{calc} (—), S_{calc} (—) e P_{calc} (—) em 30°C.....	31
FIGURA 24 Representação gráfica dos dados experimentais X_{exp} (■), S_{exp} (●) e P_{exp} (▲) e dos valores calculados pelos modelos X_{calc} (—), S_{calc} (—) e P_{calc} (—) em 28°C.....	31
FIGURA 1A Curva padrão para identificação da concentração de biomassa do microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005.....	39
FIGURA 1B Curva padrão para quantificação de surfactina nas amostras analisadas.....	41

FIGURA 2B Curva padrão para identificação da concentração de surfactina nos ensaios fermentativos utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI005.....	41
FIGURA 1C Curva padrão para identificação da concentração de glicerol usada nas fermentações de 28 e 34°C.....	40
FIGURA 2C Curva padrão para identificação da concentração de glicerol usada nas fermentações de 30 e 32°C.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.....	3
TABELA 2	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos encontrados.....	5
TABELA 3	Microrganismos produtores de glicerol.....	7
TABELA 4	Composição do meio mineral.....	12
TABELA 5	Composição da solução de micronutrientes.....	13
TABELA 6	Resultados da tensão superficial para diferentes temperaturas.....	26
TABELA 7	Resultado da capacidade de emulsificação das amostras em diferentes temperaturas.....	27
TABELA 8	Resultado da capacidade de emulsificação das amostras em diferentes temperaturas utilizando-se óleo de soja e N-hexadecano.....	27
TABELA 9	Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo aos dados experimentais de crescimento celular nas diferentes temperaturas.....	29
TABELA 10	Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo aos dados experimentais de formação do produto nas diferentes temperaturas.....	30
TABELA 11	Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo aos dados experimentais de consumo de substrato nas diferentes temperaturas.....	30

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
E_{24}	Índice de emulsificação
H_E	Altura de emulsão
H_t	Altura total
μ_x	Velocidade específica da biomassa
μ_p	Velocidade específica do produto
μ_s	Velocidade Específica do substrato
d_x/d_t	Variação da biomassa com o tempo
d_s/d_t	Variação do substrato com o tempo
d_p/d_t	Variação do produto com o tempo
t	Tempo
P	Concentração de biossurfactante
P_0	Concentração inicial de biossurfactante
P_{MAX}	Concentração máxima de biossurfactante
P_r	Relação entre a taxa volumétrica de formação inicial do produto e a concentração inicial do mesmo
X	Concentração de biomassa
X_0	Concentração inicial de biomassa
X_{MAX}	Concentração máxima de biomassa
μ_{MAX}	Velocidade específica de crescimento máxima
$Y_{P/S}$	Produtividade de biossurfactante em relação ao substrato
$Y_{X/S}$	Produtividade de biomassa em relação ao substrato
S_0	Concentração inicial de substrato
σ	Função objetivo
Σ	Somatória
C_{exp}	Concentração experimental
C_{calc}	Concentração calculada
N	Número de pontos
K	Número de parâmetro

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	v
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 – Surfactantes e biossurfactantes.....	3
2.2 – Gênero <i>Bacillus</i>	6
2.3 – Glicerol.....	6
2.4 – Surfactina.....	8
2.5 – Temperatura.....	9
2.6 – Aplicações industriais e aspectos econômicos.....	10
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 – Materiais.....	12
3.1.1 – Microorganismo.....	12
3.1.2 – Meio mineral e solução de micronutrientes.....	12
3.1.3 – Manutenção das culturas e preparo do inóculo.....	13
3.1.4 – Fermentação em biorreator.....	14
3.2 – Métodos analíticos.....	15
3.2.1 – Tensão superficial.....	15
3.2.2 – Determinação de crescimento celular.....	15
3.2.3 – Concentração de Surfactina.....	15
3.2.4 – Concentração de Glicerol.....	16
3.2.5 – Índice de emulsificação.....	17
3.2.6 – Estimativa das velocidades específicas de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato.....	18
3.2.7 – Estimativa de parâmetros cinéticos a partir dos dados experimentais de biomassa, surfactina e consumo de glicerol.....	19
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 – Avaliação de crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto a partir dos dados experimentais.....	21
4.2 – Identificação do metabólito produzido durante o processo fermentativo.....	23

4.3 – Caracterização do biossurfactante.....	25
4.3.1 – Tensão superficial.....	25
4.3.2 – Índice de emulsificação.....	27
4.4 – Modelagem matemática do crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto em diferentes temperaturas.....	29
5 – CONCLUSÃO.....	33
6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	34
REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
APÊNDICE A.....	39
APÊNDICE B.....	40
ANEXO A.....	41

INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos com atividade tensoativa, contendo uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, produzidos por várias espécies de microrganismos como leveduras, fungos e bactérias. Esses compostos compreendem uma grande diversidade de moléculas quimicamente diferentes.

Na medida em que possuem alta atividade tensoativa, os biossurfactantes apresentam importantes propriedades, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases ^[1, 8, 39].

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é produzida a partir de derivados de petróleo. É notável, entretanto, o aumento da preocupação ambiental (novas legislações de controle do meio ambiente), o que leva à procura de biossurfactantes como alternativa aos produtos existentes. Além disso, outras propriedades destes bioprodutos como: baixa toxidez, biodegradabilidade e propriedades biológicas, os colocam como alternativas promissoras ^[1, 39].

Processos industriais e ambientais estão freqüentemente associados a condições extremas de temperatura, pressão, força iônica, pH e presença de solventes orgânicos, assim, vários estudos têm avaliado a estabilidade dos biossurfactantes frente a essas condições ^[21, 24], como o estudo da produção de biossurfactante em condições termofílicas. Isto ocorre em função da necessidade de uma avaliação do comportamento destes compostos para sua utilização.

Uma grande área de atuação dos surfactantes se refere à biorremediação, onde microrganismos capazes de degradar o petróleo atacando os hidrocarbonetos com o auxílio de biossurfactantes por eles produzidos, transformando-os em substâncias com menor toxicidade, uma vez que as atividades de prospecção de petróleo envolvem alguns riscos ao ambiente e, ocasionalmente, têm ocorrido estragos provocados por vazamentos de grandes proporções de óleo em todo o mundo. Podemos citar o acidente ocorrido no Golfo do México, onde um incêndio na plataforma “Deepwater Horizon” ocasionou o mau funcionamento de uma válvula do BOP controlada por um sistema automático, levando a um vazamento de cerca de um milhão de litros de petróleo por dia. Para o controle do vazamento foram utilizados 60 quilômetros de barreiras para tentar conter o avanço da mancha, além de 75 barcos e mais de duas mil pessoas na tentativa de retirar o máximo possível do petróleo derramado ^[38].

Algumas aplicações exigem um alto grau de pureza, como aplicações relacionadas à indústria farmacêutica e cosmética, fazendo com que os produtos finais tenham um elevado custo de produção. Porém, não existe uma elevada procura no mercado consumidor no que se refere a essas aplicações, levando a uma produção específica para um mercado bastante específico, e de pouca expressão quando comparado as exigências de produção do mercado mundial.

A produção em larga escala de biossurfactantes não se torna possível devido a sua inviabilidade econômica, uma vez que os custos de produção, recuperação e purificação são muito elevados. São várias as tentativas de se reduzir os custos desses processos como: o uso de substratos mais baratos como o suco de caju ^[5, 43] e o excedente da produção de glicerol ^[18], uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 30 % do valor do produto final ^[5]; seleção de linhagens de microorganismos com uma capacidade de produção mais elevada, realizada através de mutações e combinações genéticas; variação nas condições de aeração e utilização de sistemas que reduzam a produção de espuma, reduzindo custos como a necessidade de um sistema eficiente para o controle da mesma e aumentando o volume útil nos reatores.

A partir do que foi considerado, visamos avaliar condições de otimização na produção de surfactina, biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, através da variação de diferentes condições de temperatura em um sistema fermentativo. Avaliando também o comportamento do microorganismo utilizado, levando em consideração que ele opera em uma faixa ótima de temperatura, e acima ou abaixo dessa faixa possa ocorrer desnaturação das células ou redução de sua atividade metabólica, tornando o processo ineficiente, e assim, inviável.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Surfactantes e biosurfactantes

Surfactantes são, por definição, moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), podendo ser obtidas sinteticamente, através de reações químicas, ou naturalmente, através de microorganismos específicos [1, 21]. A palavra surfactante vem da expressão “surface active agent” (agente de atividade superficial), que apresenta como principais características, a alteração de propriedades superficiais e interfaciais de um líquido, assim como uma grande capacidade de emulsificação e formação de micelas [2, 9, 23, 36, 37].

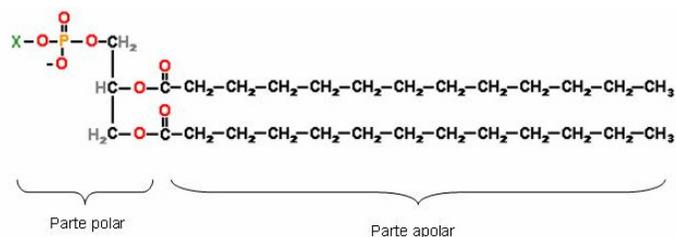


Figura 1 – Exemplo de molécula anfipática. Fonte: web.educastur.princast.es

A produção sintética de surfactantes ocorre a partir de derivados do petróleo, enquanto que a produção de biosurfactantes – subprodutos do metabolismo realizado por bactérias, fungos e leveduras de maneira extracelular ou como parte da membrana celular [35] – pode ocorrer com uso de diferentes fontes alternativas de carbono [1, 10, 20].

A Tabela 1 indica alguns dos principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.

Tabela 1 – Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biosurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betainas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Fonte: Nitschke & Maria, 2002.

Um dos critérios de fundamental importância, como já mencionado, para quaisquer processos envolvendo tensoativos é a concentração micelar crítica (CMC), visto que os efeitos desses compostos (tensões superficial e interfacial, pressão osmótica, turbidez, condutividade molar e solubilidade) são maiores quando uma quantidade significativa de micelas encontra-se presente ^[26], como representado na Figura 1.

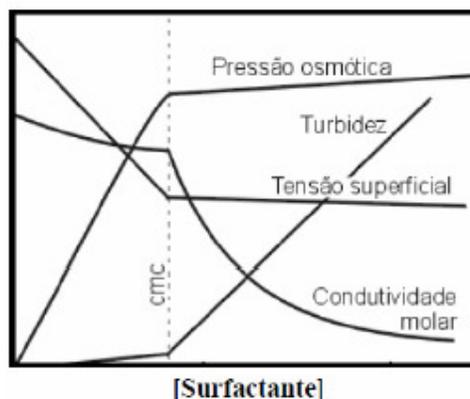


Figura 2 - Variação de algumas propriedades físico-químicas em função da concentração de surfactante.

Fonte: Medeiros, 2009.

Dentre outras propriedades importantes dos biossurfactantes podemos citar: separação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão e redução de viscosidade de líquidos ^[3, 7].

Algumas vantagens dos surfactantes naturais sobre os surfactantes sintéticos podem ser mencionadas ^[1, 2, 5, 8, 35, 36]:

- Tolerância à temperatura, pH, força iônica e salinidade;
- Biodegradabilidade;
- Baixa toxicidade;
- Podem ser produzidos a partir de fontes renováveis.

Entretanto os surfactantes naturais ainda apresentam uma grande limitação industrial devido aos altos custos de produção, recuperação e purificação; se comparados aos surfactantes produzidos sinteticamente ^[7, 8]. Assim, estudos são realizados com o objetivo de se encontrar condições que possam tornar os processos economicamente viáveis, entre esses estão: uso de matéria-prima de baixo custo ^[7, 8, 10, 20], seleção de microorganismos a partir de linhagens altamente produtoras e condições ambientais ótimas ^[8].

A Tabela 2 indica alguns dos principais microorganismos utilizados na produção de biossurfactantes e seus respectivos subprodutos metabólicos.

Tabela 2 - Principais classes de biossurfactantes e microorganismos encontrados.

Tipo de Biossurfactante	Microorganismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola, T. apicola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte: Desai & Banat, 1997.

Como verificado na tabela acima, os biossurfactantes possuem uma grande variedade de classes, garantindo assim uma elevada diversidade química e possibilitando seu uso nas mais variadas aplicações (farmacêuticas e cosméticas, petroquímica, médica, produtos alimentícios e nas áreas de proteção ao meio ambiente) [1, 9, 35, 36]. Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, uma vez que as mesmas variam com o microorganismo e substrato usados, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos [6].

2.2 – Gênero *Bacillus*

As células que compõem o gênero *Bacillus* se apresentam com formato de bastonete de 3 – 5 μm de comprimento e 1 μm de largura, frequentemente se arranjam em pares ou cadeias, além de possuírem extremidades quadradas ou arredondadas. É tipicamente composto por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas. Sua temperatura ótima é 35 °C ^[11].

É formado por um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, produtoras de esporos, que apresentam morfologia e composição enzimática e química que lhes garante uma resistência a condições adversas (faixa de temperatura, pH e salinidade ^[12]), não apresentando mais de um esporo por célula ^[11].

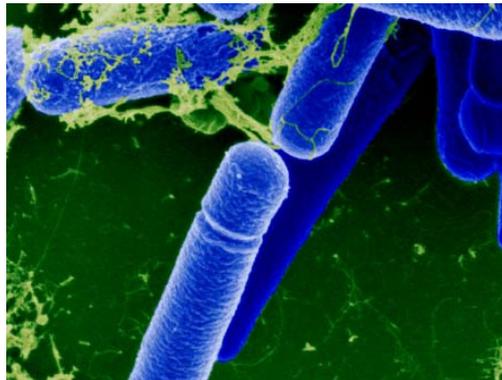


Figura 3 – Células do gênero *Bacillus*. Fonte: dailytech.com.

Como visto nas tabelas anteriores, o microorganismo *Bacillus subtilis* é produtor de lipopeptídeos e lipoproteínas, como a surfactina e a subtilisina.

Algumas espécies são patogênicas, como o *Bacillus anthracis*, mas a maioria delas é considerada própria do meio ambiente, podendo ser encontrada no solo ^[12].

2.3 – Glicerol

O glicerol é um poli álcool - também conhecido como (1,2,3 propanotriol) ou glicerina - foi descoberto em 1779 por Scheele durante o processo de saponificação do

azeite de oliva. Em 1858, Pasteur também observou a sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica [13].

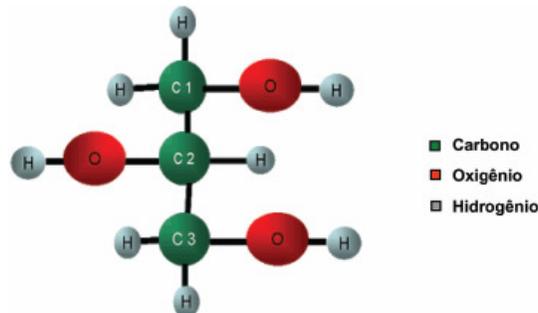


Figura 4 – Estrutura molecular do glicerol. Fonte: letiziaduarte.com/?p=47

Este álcool, com três hidroxilas, apresenta as seguintes características físico-químicas: incolor, viscoso, higroscópico e de sabor adocicado. É um importante intermediário no metabolismo dos organismos vivos, sendo encontrado naturalmente na forma combinada como glicerídeos em animais, gorduras vegetais e óleos [18], podendo também ser produzido por microorganismos, dentre eles, alguns são listados abaixo.

Tabela 3 – Microorganismos produtores de glicerol.

Gênero				
Bactérias	Leveduras	Fungos	Algas	Protozoários
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>B. coli</i>	<i>S. ellipsoideus</i>	<i>Rhizopus nigricans</i>	<i>D. bioculata</i>	<i>Leishmania mexic</i>

Fonte: Vaz *et al.*, 2007.

O glicerol é, atualmente, obtido em grande quantidade através da reação de transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel, onde ocorre a formação de 10% em volume de glicerina bruta, que se difere da glicerina pura devido à presença de impurezas e colorações diferentes, o que dificulta seu uso em processos [14].

A purificação da glicerina bruta é feita por destilação sob pressão reduzida (60 mmHg), resultando num produto límpido e transparente, denominado comercialmente de glicerina destilada ou bidestilada. O produto de calda da destilação é ajustável na faixa de 10 a 15% do peso da glicerina bruta, que pode ser denominado glicerina residual. A acidez ou alcalinidade pode ser controlada, seja por ajuste com base ou ácido fraco, seja por tratamento com resinas de troca iônica. Já as demais impurezas devem ser extraídas através do uso de coluna de destilação. A destilação primária pode ser empregada para

remover a glicerina pelo topo: temperatura 165 a 180 °C, pressão 10-20 mBar, já a destilação secundária em coluna recheada resulta na obtenção de glicerina com pureza de 99,8 a 99,9% (grau farmacêutico) e rendimento de 90 a 95% ^[17].

A glicerina apresenta valor comercial, tendo ampla utilização na indústria:

1. Cosmética, farmacêutica, na composição de cápsulas, xaropes e pomadas;
2. Química, para produção de tintas, vernizes e detergentes;
3. Alimentícia, em função de suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes ^[18];
4. Embalagens;
5. De tabaco, tornando as fibras de tabaco mais úmidas e resistentes; têxtil, para amaciar e aumentar a flexibilidade de fibras ^[15, 16].

Devemos lembrar que o glicerol também pode ser metabolizado por muitos microorganismos ^[19], e devido a isso ele foi escolhido como fonte de carbono na fermentação para a produção de surfactina.

2.4 – Surfactina

Em 1968, Arima e colaboradores descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis* denominando-o surfactina ^[2]. Sua atividade biológica depende tanto da composição de aminoácidos e da seqüência do peptídeo como da natureza da sua parte lipídica ^[2]. Sendo conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20 °C) de 72 para 27 mN/m ^[2, 20].

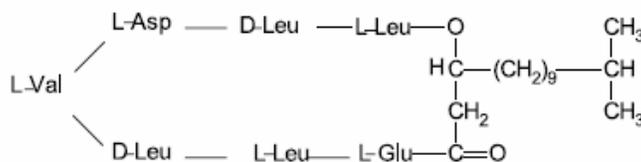


Figura 5 – Estrutura molecular da surfactina. Fonte: Nitschke & Maria, 2002.

Possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial se comparada a outros biossurfactantes. Vários experimentos têm demonstrado que a surfactina é bastante estável quando submetida a diversas condições, porém, suas propriedades físico-químicas podem variar ligeiramente devido a variações no tamanho da cadeia, como mencionado anteriormente [2].

Apresenta três funções principais, sendo elas: aumentar a área superficial de substratos hidrofóbicos insolúveis em água, aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos pelo aumento de sua solubilidade aparente e influenciar a adesão de microrganismos a superfícies [2].

A surfactina é um dos biossurfactantes mais potentes [22, 24], possuindo várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membrana, atividade anti-bacteriana e antifúngica, atividade antiviral e ação anticarcinogênica [1, 2, 22, 23, 25].

Estudos de toxicidade *in vivo* em ratos demonstraram uma baixa toxicidade, e assim, talvez não seja necessário que a surfactina seja completamente removida de todos os produtos, apenas de alguns tipos determinados [2].

2.5 – Temperatura

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes capazes de afetar o crescimento e desenvolvimento de microorganismos [27].

A faixa de temperatura na qual o crescimento de microorganismos é detectado vai de -12 °C a aproximadamente 112 °C, onde foram verificadas mudanças drásticas nas velocidades químicas de reações e propriedades das biomoléculas, daí o motivo pelo qual os microorganismos só crescem em uma faixa de temperatura limitada [28].

Alguns microorganismos têm a capacidade de se desenvolver em temperaturas superiores a 50 °C, e são denominados termófilos [27, 28]. Esses microorganismos são capazes de realizar tal tarefa devido a sua capacidade de sintetizar constituintes celulares com uma estabilidade maior ao calor [28].

O uso de microorganismo termófilos vem sendo sugerido em aplicações biotecnológicas devido a uma série de vantagens como: taxas de reações mais rápidas, redução no risco de contaminação, reduzido custo de resfriamento em fermentadores de

larga escala, maior solubilidade das moléculas (resultando em um aumento na produção de biomassa e produto) [21].

Em baixas temperaturas, a taxa de reações enzimáticas e o sistema de transporte se reduzem. A fluidez e a rigidez das membranas também se mostraram como fatores determinantes [28].

2.6 – Aplicações industriais e aspectos econômicos

Na última década, a demanda por surfactantes na indústria química Norte Americana aumentou em 300% [1, 36]. A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de ton/ano, onde sua utilização se concentra nas indústrias de petróleo, de cosméticos, de produtos de higiene e de limpeza [2].

Os biosurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em solução aquosa [1].

Possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membrana, atividade anti-bacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral [1, 2, 22, 23, 25].

A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas. Os biosurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas.

Outros campos de utilização dos biosurfactantes incluem a indústria de papel, têxtil, cerâmica, mineração, produtos de higiene e cosméticos. O biodispersan tem aplicação na indústria de tintas, pois gera maior espalhabilidade e aumenta as propriedades de mistura [1].

As propriedades de estabilização de espuma são necessárias na fabricação de extintores de incêndio, onde os biosurfactantes atuam na composição química.

Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem [6, 36, 37].

Assim, fica clara a necessidade de um aumento na produção de surfactantes em escala mundial – devido ao crescimento de seu consumo nas mais diversas áreas, necessidade de um substituto menos agressivo ao ambiente e que atue mais

especificamente e com maior eficiência – características bem representadas através dos surfactantes naturais. Porém, do ponto de vista econômico, os biosurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes oriundos da síntese química [5, 7, 39, 40]. Essa razão está associada ao seu alto custo de produção pela utilização de substratos caros, além de deficiências dos processos de recuperação e purificação, que chegam a responder por até 60% dos custos de produção [1, 5, 39, 40].

São várias as tentativas de se reduzir os custos desses processos como: o uso de substratos mais baratos como o suco de caju e o excedente da produção de glicerol, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 30 % do valor do produto final [5, 10, 39]; seleção de linhagens de microorganismos com uma capacidade de produção mais elevada, realizada através de mutações e combinações genéticas; variação nas condições de aeração e utilização de sistemas que reduzam a produção de espuma, reduzindo custos como a necessidade de um sistema eficiente para o controle da mesma e aumentando o volume útil nos reatores.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.1 – Microorganismo

Neste trabalho foi utilizada a linhagem de *Bacillus subtilis* LAMI005 não patógeno, isolada do tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do Campus do Pici (ETE-PICI) e cedida, da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI), pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Os microorganismos foram estocados em placa contendo meio de cultivo e armazenados a baixa temperatura (4 °C).



Figura 6 – Placa de Petri contendo *Bacillus subtilis* em Agar nutritivo.

3.1.2 – Meio mineral e solução de micronutrientes

Para o preparo de uma solução de 3L do meio mineral (MM) foi usada a composição descrita na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição do meio mineral.

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

Fonte: Mórán *et al.*, 2000.

Após o preparo do meio, foram adicionados 20 g.L⁻¹ de glicerina (principal substrato) e se ajustou o pH para 7,0.

Antes do início da fermentação, adiciona-se 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes, cuja composição é exibida na Tabela 5, a solução de 3L de meio nutriente (MM + glicerina).

Tabela 5 – Composição da solução de micronutrientes.

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

Fonte: Mórán *et al.*, 2000.

3.1.3 – Manutenção das culturas e preparo do inóculo

A linhagem bacteriana era mantida em Agar contendo os nutrientes necessários e armazenada a temperatura de aproximadamente 4 °C. Foram realizados repiques periódicos a cada duas semanas, tempo aproximado entre cada fermentação.

Para o preparo do inóculo, a cultura em estoque foi ativada e repicada em placa de Petri contendo Agar nutriente, incubada em estufa (Odontobrás ECB 1.3 digital) por um período de 48 horas a 30 °C. Após o tempo de incubação na estufa, a placa contendo o microorganismo e inóculo previamente esterilizado em autoclave vertical (Phoenix) - por 10 min a 110 °C foram levados à capela (Labconco, classe II), para manter as condições de esterilidade, onde três alças contendo microorganismos foram transferidas para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meio nutriente. Após a inoculação, o Erlenmeyer foi levado à mesa agitadora (Shaker Tecnal TE-420) a 180 rpm e 30 °C por 48 horas, ver Figura 7.

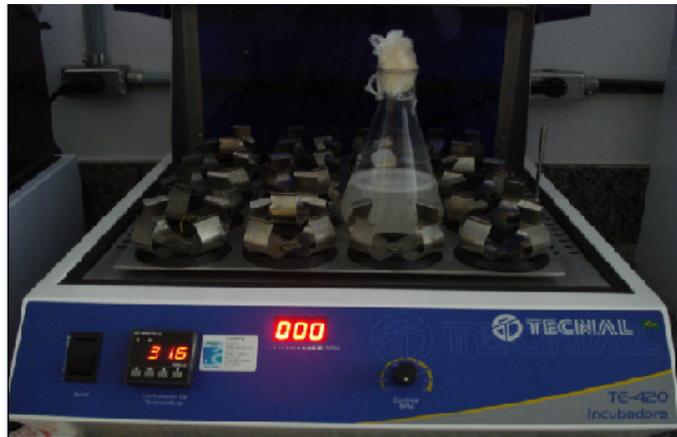


Figura 7 – Inóculo em mesa agitadora.

3.1.4 – Fermentação em biorreator

A fermentação em biorreator (Marconi, 4L), ver Figura 8, foi iniciada nas condições operacionais desejadas, após a inserção do meio nutriente e inóculo, que foram:

- Vazão de oxigênio: $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ (controlada por rotâmetro);
- Rotação: 200 rpm (controlada por sistema de controle LabView);
- Diferentes temperaturas para cada ensaio fermentativo.



Figura 8 – Sistema utilizado para realização das fermentações.

Foi utilizado um eletrodo de pH (Digimed) para acompanhar e manter as condições de neutralidade do meio, além de um eletrodo de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo) para verificação do percentual de oxigênio na solução. Foi usada também uma bomba para reciclo de células e espuma, conforme descrito por Giro *et al.*, 2009^[43].

3.2 – Métodos analíticos

3.2.1 – Tensão superficial

A tensão superficial (mN/m) das amostras livres de células foram determinadas de acordo com o método do anel De Nouy ^[32], a 25 °C, em um tensiômetro (Kruss K6), ver Figura 9. Utilizaram-se 30 mL de água destilada para calibração do equipamento e 30 mL de amostra livre de células para análise em triplicata.

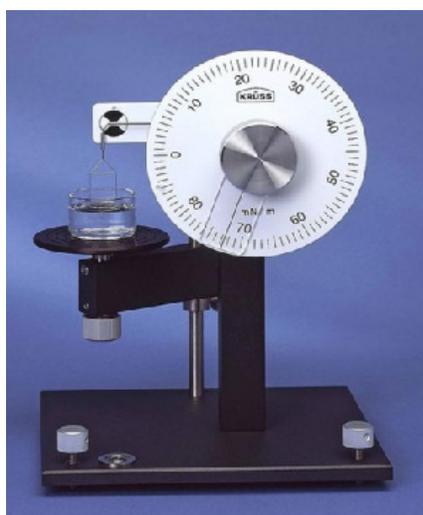


Figura 9 – Tensiômetro utilizado para análise de tensão superficial.

3.2.2 – Determinação de crescimento celular

A determinação do crescimento celular foi acompanhada através da densidade óptica (DO) em cada amostra utilizando-se um espectrofotômetro de luz UV visível (Genesys série 20) a 600 nm, calibrado com água destilada. Este método baseia-se na relação entre turbidez do meio com a quantidade de células presentes em suspensão.

A biomassa (g.L^{-1}) é determinada então pelo uso de uma curva de calibração de massa seca por densidade ótica ^[24] (Apêndice A).

3.2.3 – Concentração de Surfactina

Para determinação da concentração de surfactina é necessária a extração do biosurfactante, assim, ajustou-se o pH de 20 mL de amostra do meio fermentativo livre

de células para 2,0 com HCl 3 M. A solução resultante foi mantida em repouso a 4 °C por 24 horas para que houvesse a precipitação da surfactina.

Após o período de repouso, centrifugou-se a solução rica em surfactina por 15 min a 10.000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, dissolvido em 8 mL de água deionizada pH 8,0. Realizou-se então, uma extração líquido-líquido com uso de diclorometano (1:1) em funis de separação – agitou-se por 5 min, seguido por 1 hora de repouso para que a separação possa ocorrer - e a fase mais densa foi recolhida em Becker. O processo de extração foi realizado três vezes para garantir a extração eficiente do biosurfactante. Durante a etapa de extração foram utilizados EPI (Equipamentos de Proteção Individual) específicos como máscara, devido às características tóxicas do solvente utilizado.

A fase densa armazenada em Becker foi evaporada a temperatura ambiente, e então ressuspensa em 2 mL de metanol. Recolhem-se alíquotas para serem armazenadas em “vials” que foram analisadas em HPLC - Cromatografia Líquida de Alto Desempenho - acoplado com detector UV (Waters, modelo 2487) e equipado com a coluna de fase reversa (Symmetry C₁₈). A fase móvel utilizada consistiu de 20 % de ácido trifluoroacético e 80 % de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ e temperatura ambiente. A surfactina foi detectada usando detector UV (Waters, modelo 2487) a 205 nm. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração com surfactina padrão (Anexo C).



Figura 10 – Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC).

3.2.4 – Concentração de Glicerol

Para a análise da concentração de substrato presente no caldo livre de células foi utilizado um kit para determinação de triglicérides (Katal), constituído de dois frascos - de

90 mL cada - contendo tampão, dois frascos – de 10 mL cada - contendo enzimas e um frasco de 5 mL contendo uma solução padrão.

Preparou-se o reagente de cor ao se adicionar o conteúdo de um dos frascos contendo enzimas a um dos frascos de tampão, homogeneizando bem.

Posteriormente adicionam-se 2 mL de reagente de cor à 0,02 mL da amostra. A mistura foi levada para banho-maria (Tecnal, modelo TE-0541/1) a 37°C por 10 min. Após isso, determinou-se a absorbância das amostras (ver Figura 11), frente a um branco – 2mL de reagente de cor adicionados a 0,02 mL de água destilada – também tratado em banho-maria nas mesmas condições, a 500nm.

A concentração de glicerol (g.L^{-1}) foi determinada então pelo uso de uma curva de calibração realizada para o kit enzimático utilizado (Anexo B).

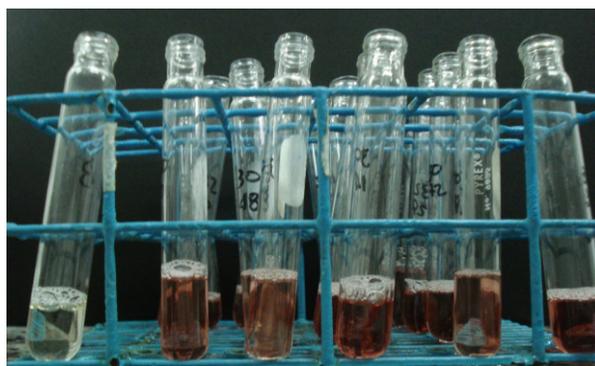


Figura 11 – Análise de glicerol pelo uso de reagente de cor.

3.2.5 – Índice de emulsificação

A determinação do índice de emulsificação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Copper & Goldenberg^[33], 2 mL do caldo fermentado livre de células foram adicionados à 2 mL de diferentes fontes hidrofóbicas (óleo de motor, querosene, óleo de soja e N-Hexadecano) em um tubo de ensaio de fundo chato. Posteriormente, agitou-se a mistura por 2 min em Vortex (Phoenix AP56), deixando em repouso. Após 24 horas, verificou-se a formação, ou não, de emulsão (ver Figura 12) e registraram-se os valores de altura total e altura de emulsão.

Calculou-se então o índice de emulsificação de acordo com Desai & Banat^[34], ver equação 1.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_E}{H_t} * 100 \quad (1)$$



Figura 12 – Emulsões formadas a partir de diferentes fontes hidrofóbicas.

3.2.6 – Estimativa das velocidades específicas de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato

Os dados coletados a partir dos ensaios fermentativos foram usados para estimar as velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato (μ_s)^[35], para identificação do tipo de metabólito produzido, como mostrado abaixo. Para tal, foram utilizados os softwares Origin 6.0, 8.0 e Microsoft Excel 2003 e as equações descritas por Schmidell *et al.*, 2001^[34]:

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{d_x}{d_t} \quad (2)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{x} \frac{d_s}{d_t} \quad (3)$$

$$\mu_p = \frac{1}{x} \frac{d_p}{d_t} \quad (4)$$

3.2.7 – Estimativa de parâmetros cinéticos a partir dos dados experimentais de biomassa, surfactina e consumo de glicerol

Os modelos cinéticos propostos para a formação de biomassa, consumo de substrato e produção de surfactina foram ajustados aos dados experimentais utilizando o solver do Software Microsoft Excel 2003, através de regressões não-lineares usando o método dos mínimos quadrados. A produção de biossurfactante foi modelada matematicamente seguindo a Equação 5 para a produção de ácido láctico [41].

$$P = \frac{P_0 P_{MAX} e^{P_r t}}{P_{MAX} - P_0 + P_0 e^{P_r t}} \quad (5)$$

onde t é o tempo em horas, P é a concentração de biossurfactante (g/L), P_{MAX} a concentração máxima do biossurfactante (g/L) e P_r é a relação entre a taxa volumétrica de formação inicial do produto e a concentração inicial do produto.

A concentração de biomassa foi modelada segundo a Equação 6 [41] que pode ser representada como:

$$X = \frac{X_0 X_{MAX} e^{\mu_{MAX} t}}{X_{MAX} - X_0 + X_0 e^{\mu_{MAX} t}} \quad (6)$$

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

O consumo do substrato pode ser interpretado pela Equação 7 [41]:

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{P/S}} (P - P_0) - \frac{1}{Y_{X/S}} (X - X_0) \quad (7)$$

onde $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ representam a produtividade de biossurfactante e biomassa em relação ao substrato, respectivamente, P e P_0 são concentrações final e inicial de biossurfactante

(g/L), X e X_0 são as concentrações final e inicial de biomassa (g/L) e S_0 é a concentração inicial de substrato (g/L).

A função objetivo a ser minimizada está representada na Equação 8^[42]:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (c_{\text{exp}} - c_{\text{calc}})^2}{N - K} \quad (8)$$

onde N representa o número de pontos utilizados e K o número de parâmetros a serem estimados.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se avaliar a influência da temperatura na produção de biossurfactante, foram realizadas quatro fermentações em temperaturas diferentes e constantes, para cada ensaio. Com o objetivo de se otimizar a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005 avaliaram-se as seguintes temperaturas: 28, 30, 32 e 34°C.

4.1 – Avaliação de crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto a partir dos dados experimentais

As fermentações realizadas em biorreator a diferentes temperaturas forneceram os dados exibidos nas Figuras 13, 14 e 15. Essas figuras mostram os perfis de crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto para as temperaturas de 28, 30 e 32°C, respectivamente.

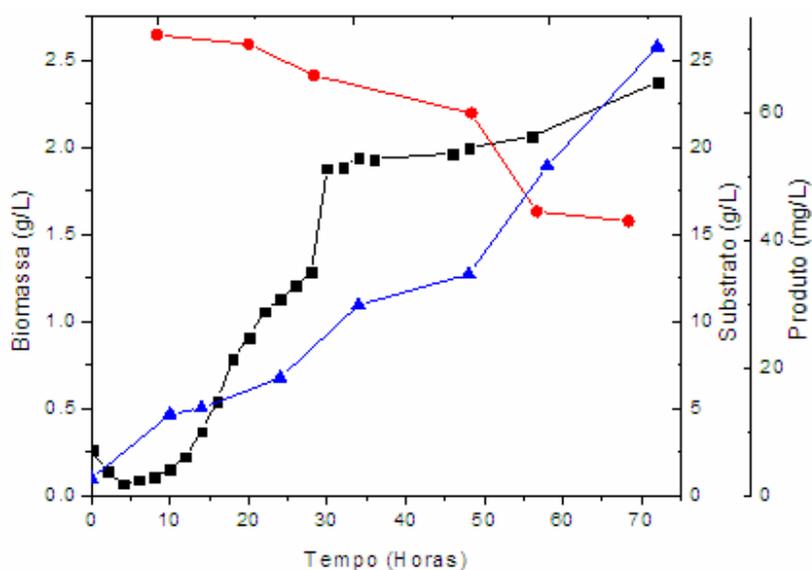


Figura 13 – Perfil de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para *Bacillus subtilis* na temperatura de 28°C.

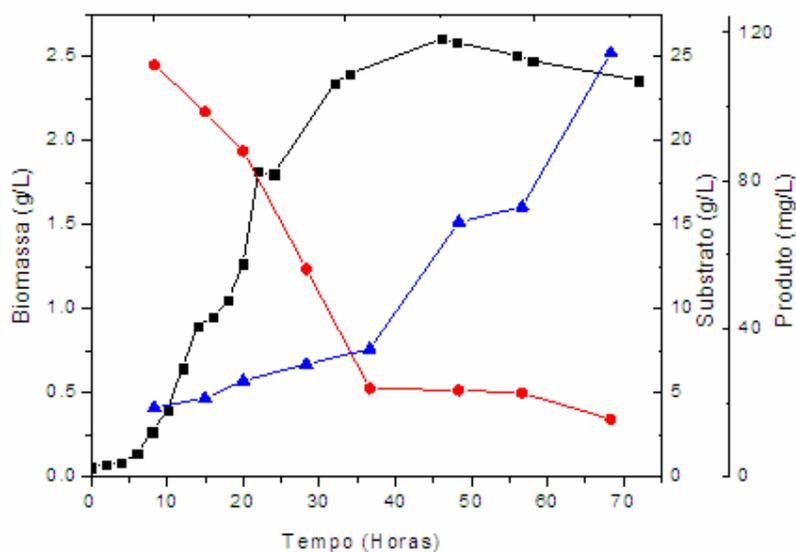


Figura 14 – Perfil de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para *Bacillus subtilis* na temperatura de 30°C.

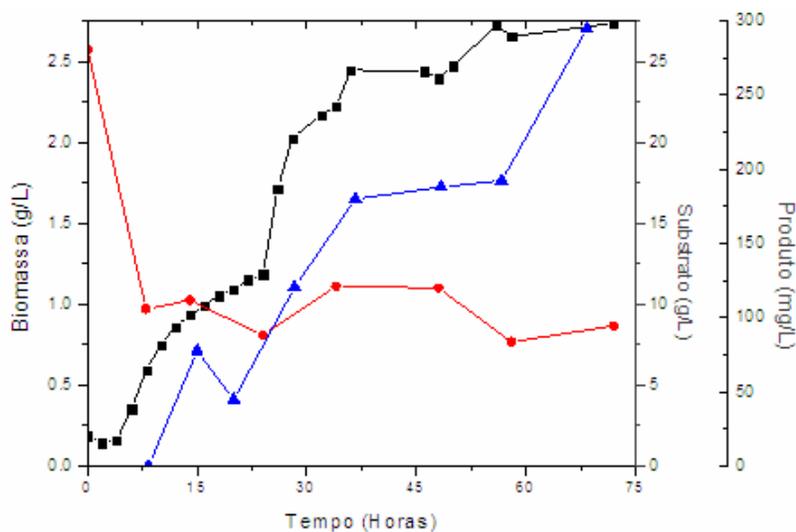


Figura 15 – Perfil de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para *Bacillus subtilis* na temperatura de 32°C.

Pode-se observar um aumento na produção de biossurfactante com o aumento da temperatura, uma vez que a concentração máxima do mesmo foi de 70,25 mg.L⁻¹; 114,62 mg.L⁻¹ e 294,91 mg.L⁻¹ nas temperatura de 28, 30 e 32°C, respectivamente.

Apesar de uma diferença de 4°C entre os extremos de temperatura avaliados (28 e 32°C), a concentração de células verificada não sofreu uma variação tão grande, chegando a 2,37 g.L⁻¹; 2,60 g.L⁻¹ e 2,74 g.L⁻¹ nas temperatura de 28, 30 e 32°C, respectivamente.

Podemos também observar que o aumento da temperatura reduziu o intervalo de tempo da fase “lag” (fase onde ocorre a adaptação do microorganismo ao meio) de cada sistema, foram obtidos tempos de aproximadamente 4, 6 e 10 horas nas respectivas temperaturas de 32, 30 e 28°C.

Durante a fermentação que buscava avaliar o impacto da temperatura de 34°C houve uma mudança muito rápida do pH do meio para 5.5. Fez-se uma tentativa para corrigi-lo através da adição de hidróxido de sódio 3M, porém a medida de pH não retornou a neutralidade apesar da adição de aproximadamente 500 mL da solução básica. Os dados de concentração não serão representados devido à formação de uma suspensão de coloração escura, diferente da usual, como mostra a Figura 16, que iria resultar em um falso valor de concentração celular ao ser analisado em espectrofotômetro.



Figura 16 – Material em suspensão presente durante a fermentação de 34°C.

Makkar & Cameotra ^[24] avaliaram a produção de biossurfactante a 45 °C por *Bacillus subtilis* MTCC 2423 através da adição de vários suplementos nutricionais e verificaram uma concentração de 342 mg.L⁻¹ com uso de extrato de leveduras como suplemento, e uma concentração de 108 mg.L⁻¹ onde o valor de pH do meio era 4.5, concentração semelhante a de 114 mg.L⁻¹ verificada na fermentação de 30 °C.

França *et al.* ^[35] verificou uma concentração de aproximadamente 300 mg.L⁻¹ utilizando meio contendo açúcares redutores totais (glicose e frutose) na concentração inicial de 30,07 g.L⁻¹ como fonte de carbono, valor semelhante ao produzido na fermentação de 32 °C.

4.2 – Identificação do metabólito produzido durante o processo fermentativo

A partir das curvas experimentais para as diferentes temperaturas, calcularam-se as velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), consumo de substrato (μ_s) e formação do produto (μ_p) a partir das Equações 2, 3 e 4; mencionadas na seção 3.2.6. As

figuras 17, 18 e 19 mostram os resultados obtidos para as temperaturas de 28, 30 e 32°C, respectivamente.

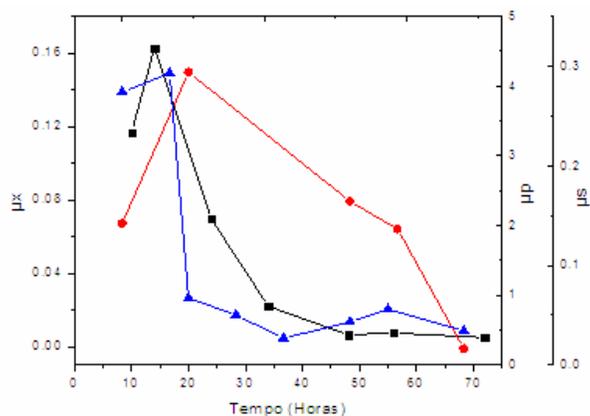


Figura 17 – Velocidade específica de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para *Bacillus subtilis* na temperatura de 28°C.

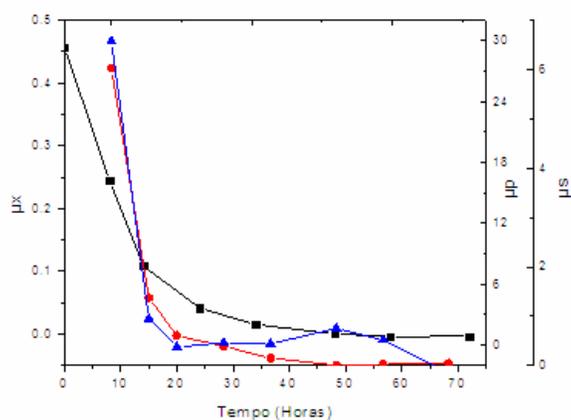


Figura 18 – Velocidade específica de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para *Bacillus subtilis* na temperatura de 30°C.

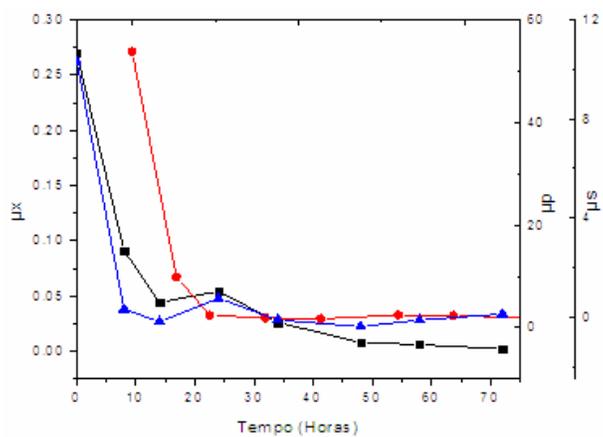


Figura 19 – Velocidade específica de crescimento celular (—■—), consumo de substrato (—●—) e formação de produto (—▲—) para *Bacillus subtilis* na temperatura de 32°C.

Pode-se observar, através das Figuras 18 e 19, que a velocidade específica de consumo de substrato e formação de produto acompanha de maneira muito semelhante o andamento da curva de crescimento celular do micorganismo, assim, pode-se afirmar que o metabólito produzido na fermentação com *Bacillus subtilis* LAMI005, nas condições mencionadas, é primário e sua formação está associada ao crescimento. Essa configuração é uma representação para o caso em que o metabólito produzido está diretamente ligado às reações de catabolismo ou decomposição de substrato^[34].

A Figura 17 mostra uma semelhança entre as curvas para os perfis de velocidade de crescimento celular e formação do produto, porém o perfil de consumo de substrato se mostrou diferente dos demais. É possível que a análise do glicerol na temperatura de 28°C tenha contribuído para resultados tão diferentes, uma vez que dois pontos representaram quedas abruptas na concentração de glicerol em curtos períodos de tempo e tiveram de ser excluídos. Outra possível explicação seria que a temperatura reduzida tenha contribuído de maneira significativa na redução do metabolismo do micorganismo e em sua decomposição do substrato, já mencionado anteriormente, fazendo com que a concentração de substrato remanescente realmente tenha sido elevada, como mostra a Figura 13. Porém, pela correlação entre as curvas de crescimento e formação de produto, pode-se dizer que se trata de um metabólito primário, associado ao crescimento celular.

4.3 – Caracterização do biossurfactante

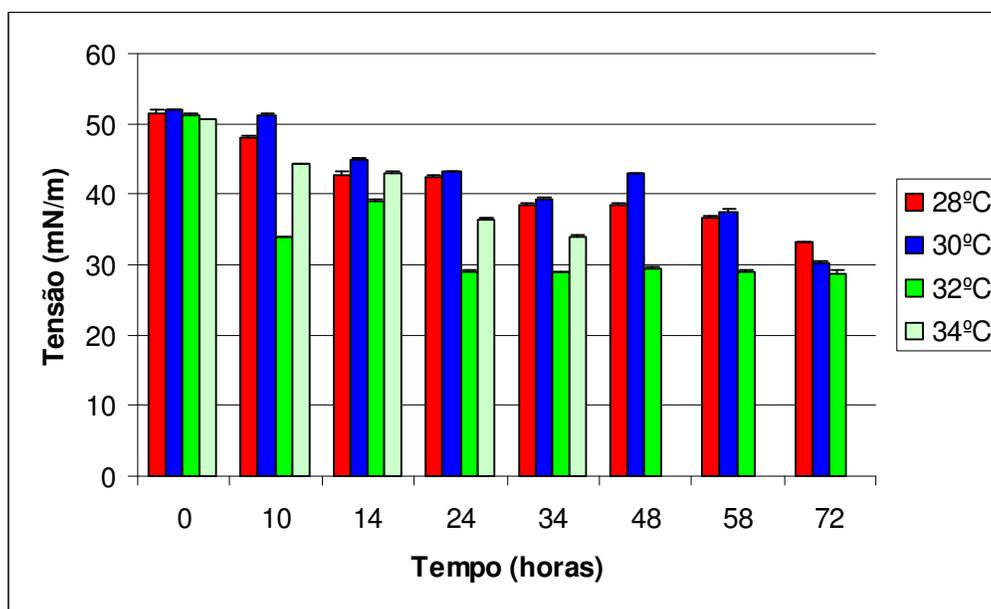
4.3.1 – Tensão superficial

Foi utilizada a análise da tensão superficial para avaliar a eficiência na redução da mesma pelo biossurfactante produzido. Espera-se uma maior presença de surfactante à medida que a tensão superficial é reduzida^[1, 26].

A Tabela 6 apresenta as medidas de tensão superficial das amostras nas diferentes temperaturas avaliadas, e a Figura 20 apresenta-as em uma forma gráfica para melhor visualização dos resultados.

Tabela 6 – Resultados da tensão superficial para diferentes temperaturas.

Tempo (hora)	Temperatura (°C)			
	28	30	32	34
0	51,5±0,5	51,97±0,15	51,3±0,33	50,5±0,1
10	48,13±0,15	51,33±0,15	34,03±0,06	44,27±0,12
14	42,8±0,36	45,0±0,1	39,07±0,24	43,1±0,1
24	42,47±0,29	43,2±0,2	29,03±0,06	36,27±0,31
34	38,47±0,29	39,23±0,23	28,83±0,21	33,97±0,15
48	38,37±0,51	42,9±0,1	29,4±0,26	--
58	36,73±0,25	37,47±0,48	29,03±0,22	--
72	33,07±0,12	30,22±0,25	28,8±0,35	--

**Figura 20** – Representação gráfica da tensão superficial do meio fermentado livre de células para as diferentes temperaturas estudadas.

Através da Tabela 6 e da Figura 20 podemos observar uma redução na tensão superficial à medida que o tempo de fermentação transcorre, indicando um aumento na concentração de surfactina dissolvida na amostra analisada.

Ao compararmos os resultados entre temperaturas diferentes, por exemplo, 28 e 32°C, observa-se uma redução mais acentuada da tensão superficial na temperatura mais elevada.

O menor valor para tensão superficial obtido foi de $28,8 \pm 0,35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, isso nos leva a crer que a maior concentração de surfactina dentre todas as amostras foi a de 72 horas para a fermentação de 32 °C, fato que se mostrou comprovado ao realizarmos a análise quantitativa de surfactina em HPLC, ver Figura 15.

4.3.2 – Índice de emulsificação

Além da análise qualitativa de tensão superficial, também foi realizada a análise através do índice de emulsificação visando avaliar outra característica importante dos surfactantes, a capacidade de formar emulsões [2, 9, 23, 36, 37].

Como o objetivo foi apenas verificar a capacidade ou não de formação de emulsão a partir do biosurfactante produzido, não foi necessária a avaliação de todos os pontos. Alguns pontos de cada fermentação foram escolhidos para que a análise fosse realizada, o critério utilizado para tal escolha foi o resultado da tensão superficial, uma vez que a redução da tensão superficial serve como indicativo da presença de surfactantes em seu meio.

A Tabela 7 mostra de maneira resumida o resultado do teste de emulsificação, onde o símbolo (+) indica a formação de emulsão, o símbolo (-) indica que não houve formação de emulsão e o símbolo (--) indica que a amostra naquela temperatura não foi avaliada.

Tabela 7 – Resultado da capacidade de emulsificação das amostras em diferentes temperaturas utilizando-se óleo de motor e querosene.

Tempo (hora)	Temperatura (°C)							
	28		30		32		34	
	Q.	O.M.	Q.	O.M.	Q.	O.M.	Q.	O.M.
14	--	--	--	--	--	--	-	+
24	-	+	-	+	-	+	-	+
34	-	+	-	+	-	+	-	-
48	--	--	--	--	-	+	--	--

Tabela 8 – Resultado da capacidade de emulsificação das amostras em diferentes temperaturas utilizando-se óleo de soja e N-hexadecano.

Tempo (hora)	Temperatura (°C)							
	28		30		32		34	
	N-H.	O.S.	N-H.	O.S.	N-H.	O.S.	N-H.	O.S.
14	--	--	--	--	--	--	-	+
24	-	-	-	-	+	+	-	+
34	-	-	-	-	+	+	-	+
48	--	--	--	--	+	+	--	--

Pela tabela 7 verifica-se que não foi formada emulsão em nenhuma amostra cuja fonte hidrofóbica tenha sido o querosene, e em quase todas as amostras em que a fonte hidrofóbica foi o óleo de motor houve formação de emulsão. Estas emulsões se mantiveram após um período de 24 horas de repouso, indicando que a concentração de surfactante naquela amostra era suficiente para manter a estabilidade de emulsão.

A amostra de 34 horas em 34°C, porém, não foi capaz de manter a emulsão em óleo de motor, como mostra a Figura 21. Uma possível explicação para o acontecido é que, como já foi mencionado, o pH nesta temperatura se tornou mais ácido que o normal e a surfactina no meio tenha precipitado, e assim, reduzindo a capacidade de emulsificação da amostra.

O resultado mostrado na Figura 21 nos leva a crer que a concentração de surfactina no meio tenha diminuído devido à acidez do meio, mas se voltarmos a Figura 20, e observarmos o valor da tensão superficial na amostra de 34 horas para a fermentação em 34 °C verificamos que houve uma redução da tensão superficial, e isso nos leva a crer que na verdade houve um aumento na concentração de surfactina.



Figura 21 – Resultado da capacidade de emulsificação na fermentação em 34°C.

Ao realizar-se a agitação do branco, contendo óleo de motor e água deionizada pH 8.0, verificou-se a formação de uma emulsão estável de coloração semelhante a das emulsões formadas a partir da agitação dos tubos contendo óleo de motor e meio fermentado livre de células. Apesar de ambas as emulsões apresentarem coloração semelhante, verificou-se que a emulsão a partir das amostras (onde a surfactina está presente) apresentou uma maior viscosidade quando comparada ao branco.

A formação de emulsão a partir do branco pode ser explicada devido à presença dos derivados de petróleo, a partir dos quais alguns surfactantes são produzidos, e aditivos não especificados, utilizados para melhor desempenho, contidos no óleo de motor

A Tabela 8 mostra a formação de emulsões estáveis utilizando as duas fontes hidrofóbicas em questão (óleo de soja e N-hexadecano) para as amostras analisadas da fermentação em 32 °C. Porém, o mesmo não ocorre para as respectivas amostras na fermentação realizada em 34 °C quando se utiliza o N-hexadecano, fato inesperado, uma vez que se esperava uma maior concentração de surfacina devido ao aumento da temperatura, fazendo com que houvesse a formação de emulsão.

As análises mencionadas são apenas de caráter qualitativo, e assim, servem apenas como indicação da produção do biossurfactante, especialmente a tensão superficial que utiliza equipamento muito sensível e por isso é mais precisa, porém com facilidade para descalibrar.

Devido à indisponibilidade do cromatógrafo, capaz de realizar uma análise de caráter quantitativo que poderia fornecer dados precisos de concentração de biossurfactante, no período de desenvolvimento da monografia, não é possível que cheguemos a uma conclusão sobre o ocorrido.

4.4 – Modelagem matemática do crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto em diferentes temperaturas

Através de uma comparação entre o modelo cinético, equações 5, 6, 7 e 8 - apresentadas na seção 3.2.7, e os dados experimentais, pode-se estimar os parâmetros cinéticos, utilizando o método dos mínimos quadrados e o solver do Microsoft Excel 2003. Esta etapa foi uma tentativa de se encontrar modelos que possam representar o comportamento verificado nas diferentes condições de processo.

As tabelas 8, 9 e 10 mostram os resultados dos ajustes dos modelos utilizados aos dados experimentais, com a especificação dos parâmetros estimados. As Figuras 22 a 24 mostram o ajuste do modelo aos dados experimentais, para as três temperaturas avaliadas.

Tabela 9 – Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo aos dados experimentais de crescimento celular nas diferentes temperaturas.

Crescimento celular				
Temperatura (°C)	μ_{\max} (h ⁻¹)	X_{\max}	X_0	R ²
		g/L		
28	0.168826	2.1425	0.045171	0.985

30	0.190381	2.5112	0.070251	0.992
32	0.113112	2.6901	0.21603	0.988

Tabela 10 – Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo aos dados experimentais de formação de produto nas diferentes temperaturas.

Formação do produto				
Temperatura (°C)	P ₀	P _{max}	P _r	R ²
	g/L			
28	0.0077	0.1455	0.03890	0.981
30	0.0167	5.8854	0.02689	0.979
32	0.0371	0.3009	0.05552	0.894

Tabela 11 – Parâmetros obtidos através do ajuste do modelo aos dados experimentais de consumo de substrato nas diferentes temperaturas.

Consumo de substrato				
Temperatura (°C)	Y _{p/s}	Y _{x/s}	S ₀	R ²
	g/g		g/L	
28	2.2891	0.0350	26.47429	0.945
30	49.8459	0.0321	20.74914	0.9033
32	32.4865	0.0842	14.83230	0.253

Os modelos propostos para o crescimento celular e formação do produto - com exceção da temperatura de 32 °C - se ajustaram muito bem aos dados, fato que pode ser verificado pelos valores de R², ver Tabelas 8 e 9, que se encontram em torno de 0.98 ou acima dele.

O modelo proposto para o consumo de substrato se mostrou incapaz de se ajustar aos dados experimentais, especialmente aos dados da temperatura de 32 °C. Esse fato pode ser explicado devido o glicerol sofrer variações bruscas seguidas de picos na concentração, como mostrado na Figura 22. Uma maneira de corrigir tal fato seria a obtenção de mais pontos para melhorar o ajuste da curva e também tentar ser mais preciso na análise da concentração de glicerol.

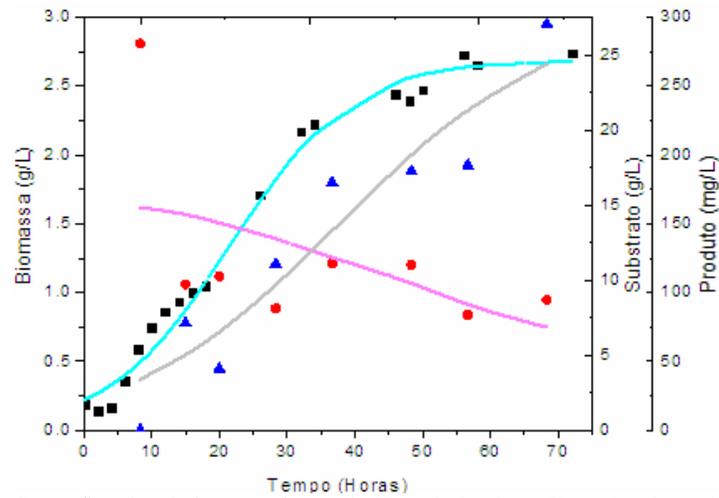


Figura 22 – Representação gráfica dos dados experimentais X_{esp} (■), S_{exp} (●) e P_{exp} (▲) e dos valores calculados pelos modelos X_{calc} (—), S_{calc} (—) e P_{calc} (—) em 32°C.

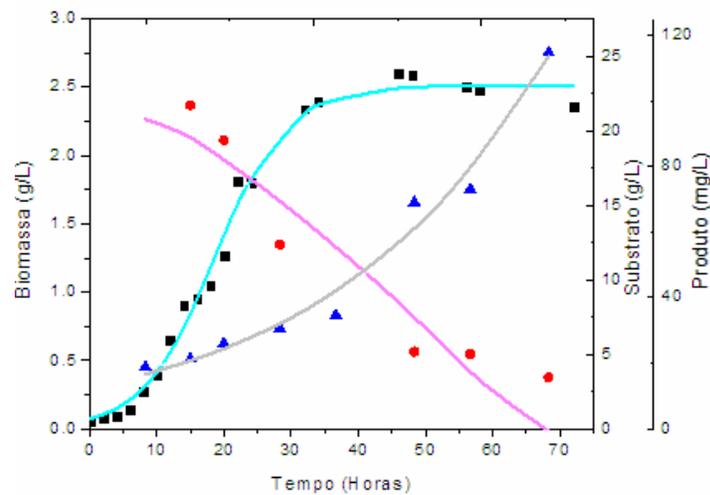


Figura 23 – Representação gráfica dos dados experimentais X_{esp} (■), S_{exp} (●) e P_{exp} (▲) e dos valores calculados pelos modelos X_{calc} (—), S_{calc} (—) e P_{calc} (—) em 30°C.

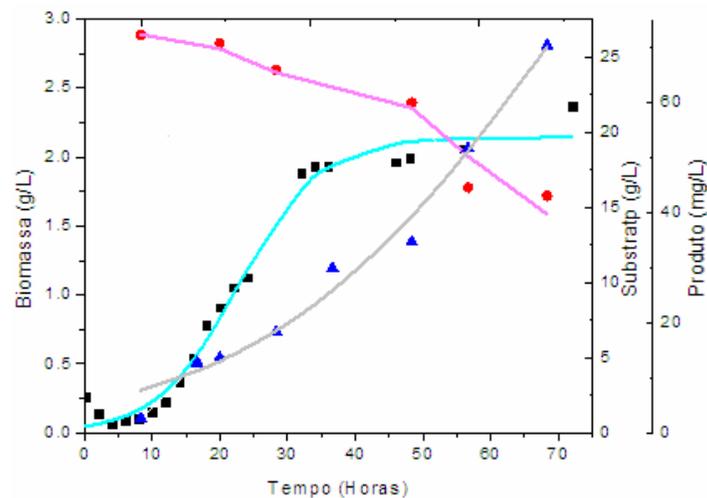


Figura 24 – Representação gráfica dos dados experimentais X_{esp} (■), S_{exp} (●) e P_{exp} (▲) e dos valores calculados pelos modelos X_{calc} (—), S_{calc} (—) e P_{calc} (—) em 28°C.

Nas Figuras 22 a 24, pode-se visualizar um bom ajuste dos modelos aos dados para as curvas de crescimento celular e formação de produto, porém é aconselhável que se obtenha um modelo diferente para representar a concentração de glicerol. Pelo que se pode ver, os pontos que representam a concentração de glicerol oscilam bastante, então deve-se considerar a reavaliação da concentração numa tentativa de se obter dados mais precisos, e assim, mais representativos.

5 – CONCLUSÃO

Os dados de perfil de crescimento celular nas diferentes temperaturas indicam que a temperatura tem influência na concentração celular máxima, mas seu impacto não chega a ser tão grande visto que a concentração máxima variou apenas $0,37 \text{ g.L}^{-1}$, para um intervalo de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pelo que foi verificado nas curvas de velocidade específica do crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, pode-se afirmar que o biossurfactante produzido é um metabólito primário, ou seja, sua formação está associada ao crescimento celular no meio.

O biossurfactante se mostrou eficiente, pois foi capaz de reduzir a tensão superficial das amostras de maneira expressiva apesar de baixas concentrações terem sido obtidas nas temperaturas de 28 e 30°C . Sendo capaz de reduzir o valor de tensão para um mínimo de $28,8 \pm 0,35 \text{ mN.m}^{-1}$ na temperatura de 32°C , bem próximo ao valor de 27 mN.m^{-1} encontrado na literatura [2, 20].

Os modelos matemáticos utilizados foram capazes de se ajustar bem aos dados experimentais, com exceção do modelo para representação da concentração de glicerol.

De maneira geral, os ensaios fermentativos mostraram que a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005 ocorre de maneira mais efetiva em temperaturas elevadas, partindo de um máximo de $70,25 \text{ mg.L}^{-1}$ em 28°C à 295 mg.L^{-1} em 32°C .

6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Existe ainda uma grande quantidade de combinações a serem realizadas entre as diferentes condições operacionais possíveis, havendo assim uma necessidade de se avaliar:

- Uma faixa de temperatura mais ampla na qual o microorganismo possa se desenvolver e produzir maior quantidade de biossurfactante;
- Uso de diferentes substratos que possam levar a uma maior produção de surfactina em uma temperatura mais elevada;
- Aplicar diferentes modelos matemáticos para encontrar um que se ajuste melhor aos dados experimentais de concentração de substrato;
- Testar diferentes condições de aeração e agitação;
- Caracterizar o biossurfactante produzido;
- Analisar sua toxicidade.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NITSCHKE, M.; MARIA, G. P. (2002), Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776.
2. FÁBIO, F. C. B.; PEREIRA, C. Q.; ROBERTO, M. M. J.; MARIA, G. P. (2007), Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414.
3. FIECHTER, A (1992), Biosurfactantes: moving towards industrial application. **Trends in Food science and Technology**, n. 31, p. 283-293.
4. DESAI, J. D.; BANAT, I.M. (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, p. 61, 47.
5. ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S; GIRO M. E. A; Gonçalves, L. R. B. (2007), Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de cajú. 4º **PDPETRO**, Campinas, São Paulo.
6. MEDEIROS, S. M. (2009); **Estudo da auto-associação de bipolímeros com surfactantes**. Dissertação de Mestrado, Florianópolis, p. 5.
7. JACQUES, C. B. L.; FLÁVIA, E. C. S.; LUIZ, V. C. (2007), Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactante. **Ciência & Engenharia**, v. 16, n. 1/2, p. 73 – 79.
8. MESSIAS, S. B. (2008), **Bactérias produtoras de biossurfactantes: Isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. Tese de Doutorado, São José do Rio Preto, p. 19 - 23.
9. MESSIAS, S. B.; NAVARRO, A. S.; HUMBERTO, C. G. C. (2010), Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577.
10. MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. (2006), Towards commercial production of microbial surfactants. **ScienceDirect**, v.24, n.11, p. 509 – 515.

11. HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. (1994), **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, p. 659, 660 e 787.
12. ENCINAS, J. P.; SANZ-GOMES, J.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GARCIA-ARMESTO, M. R.; OTERO, A. (1996), Evaluation of different systems for identification of *Bacillus* strains isolated from spanish fermented sausages. **Meat Science**, v.42, p.127-131.
13. TOSETTO, M. G.; ANDRIETTA, S. R. (2003), Cinética de produção de glicerol em processo de fermentação alcoólica utilizando diferentes matérias primas industriais. SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES. **Anais do 14º SINAFERM**, Florianópolis.
14. XAVIER, D.; VALENÇA, M. B.; PASCOAL, E.; MEDEIROS, N.; LUCENA, S.. **Nova Aplicação da Glicerina a partir do Biodiesel: Processo de Gaseificação**.
15. MORRISON, L. R. (1994), Glycerol. **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, p. 921-932.
16. PIERRE, T. B. (2009), **Programa nacional de produção e uso de biodiesel: Um balanço da primeira fase até 2008**. Dissertação de Mestrado, São Paulo.
17. ÁVILA, S. F.; MACHADO, A. S.; SANTOS, E. P. **Purificação da glicerina bruta vegetal**. Bahia.
18. VAZ, P. A.; CÁSSIA, R. L. B. R.; GRAÇAS, M. A. F. (2007), Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n. 26.
19. FONSECA, P. F. A.; FELIZ, T. F.; CARDOSO, G. F.; ALICE, M. Z. C. (2009), Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and bioproducts processing**, 87, p. 179–186.
20. SANDRA L. F, GREG A. B. (2000), Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, n. 75, p. 235 – 240.
21. CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. (1998), Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Microbiol Biotechnol**, 50, p. 520 – 529.

22. KOWAL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. (1998), Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science** 204, p. 1–8.
23. GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. (1992), Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technology**, v. 10.
24. MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. (1998), Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 20, p. 48–52.
25. BANAT M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. (2000), Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53, p. 495-508.
26. KLEBSON, F. G. S.; VINICIUS, J. A. A.; CASTRO, T. N. D.; DANTAS, A. A. N.; VIANA, T. D. J.; BARROS, E. L. N. (2007), Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. **4º PDPETRO**, Campinas, São Paulo.
27. FARRELL, J.; ROSE, A., **Temperature effects on microorganisms.**
28. GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M. A. (1996), Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. **Arch Microbiol**, 166, p. 293–300.
29. DENG, X. T.; SHI, J. J.; SHAMA, G.; KONG, M. G. (2005), Effects of microbial loading and sporulation temperature on atmospheric lasma inactivation of *Bacillus subtilis* spores. **Applied Physics Letters** 87.
30. MORÁN, A. C.; MARTÍNEZ, A. M.; SIÑERIZ, F. (2000), Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. **Biotechnol. Left.**, v. 24, p. 177-180.
31. ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W. (1984), Biosurfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 1, n. 2, p. 87 107.
32. COOPÉR, D. G. e GOLDENBERG, B. G. (1987), Surface-ative agentes from two *Bacillus* species. **Appl. Environ Microbiol**, v. 53, p. 224-229.
33. DESAI, J. D. e BANAT, I. M. (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Rev.**, v 61, p. 47-64.

34. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, ed.1, v. 2, p. 539, 2001.
35. FRANÇA, I. W. L.; OLIVEIRA, D. W. F.; MONTENEGRO, D.L.; MARTINS, J.J.L.; GIRO, M.E.A., Melo, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B. (2010), Influência da concentração de substrato na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005. **XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**.
36. HENRIQUE, A. S. O.; AGUILAR, J. G.; JOSÉ, J. H. F. AMÉLIA, A. S. L., **Produção de biossurfactantes para remediação de ambientes contaminados com petróleo e derivados**.
37. HEIDTMANN, M. P.; GUIMARÃES, R. M.; ALBERTO, J. V. C. (2009), Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104-2108.
38. **Vazamento de petróleo desafia a tecnologia no Golfo do México**. Disponível em: < <http://g1.globo.com/mundo/noticia/2010/05/vazamento-de-petroleo-desafia-tecnologia-no-golfo-do-mexico.html> >. Acesso em: 2 de Nov. 2010, 19:30.
39. JOSÉ, A. G. C. (2009), **Produção de biossurfactantes a partir de co-produto da indústria de biodiesel**. São Carlos.
40. KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. (1997), Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 84, n.1, p. 41-46.
41. MERCIER, P.; YERUSHALMI, L.; ROULEU, D.; DOCHAIN, D. (1992), Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*, J. **Chem, Technol. Biotechnol.** 55, 111-121.
42. FOGLER, H. S. (2002), **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 3ª ed., Ed. LTC.
43. GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. (2009), Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal (Print)**, v. 4, p. 738-747.

APÊNDICE A

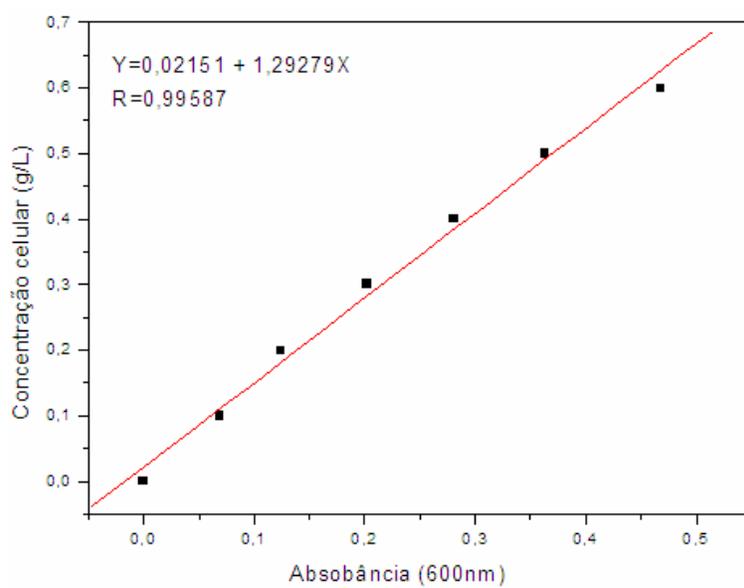


Figura 1A – Curva padrão para identificação da concentração de biomassa do microrganismo *Bacillus subtilis* LAMI005.

APÊNDICE B

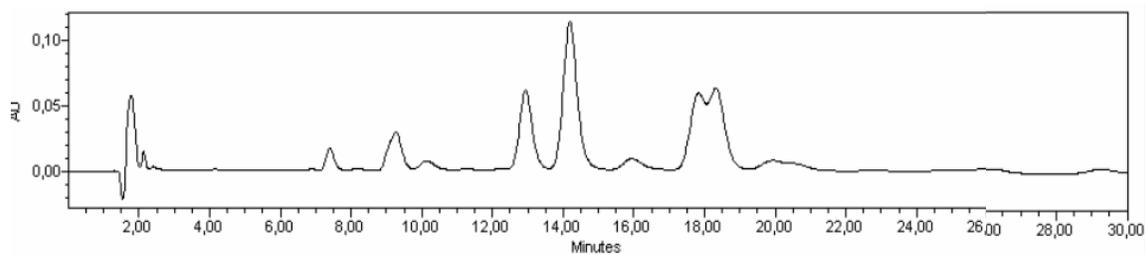


Figura 1B – Curva padrão para quantificação de surfactina nas amostras analisadas.

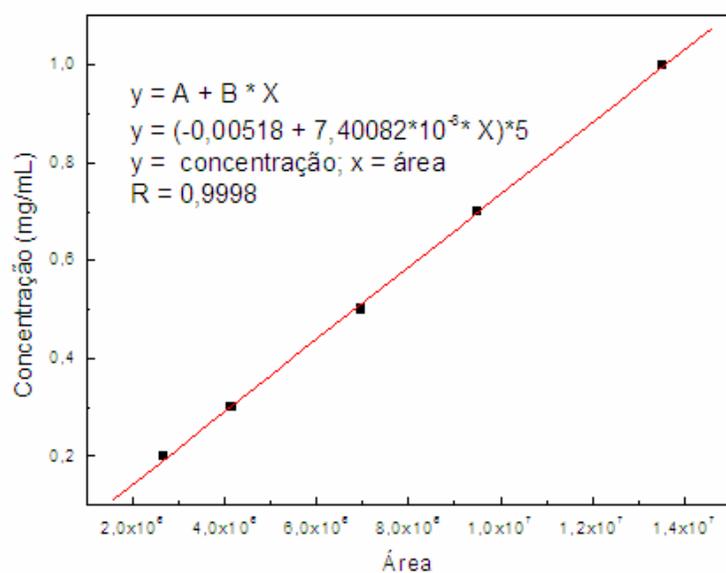


Figura 2B – Curva padrão para identificação da concentração de surfactina nos ensaios fermentativos utilizando *Bacillus subtilis* LAMI005.

ANEXO A

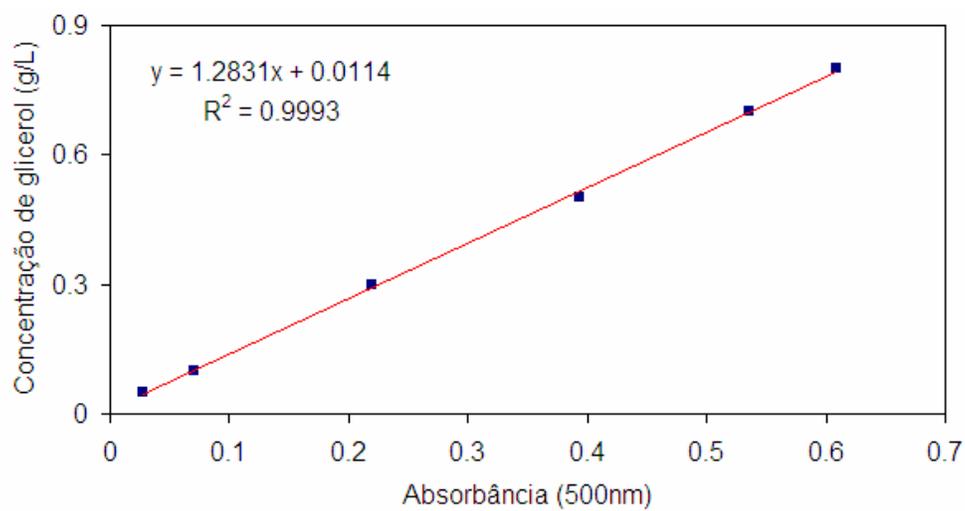


Figura 1C – Curva padrão para identificação da concentração de glicerol usada nas fermentações de 28 e 34°C.

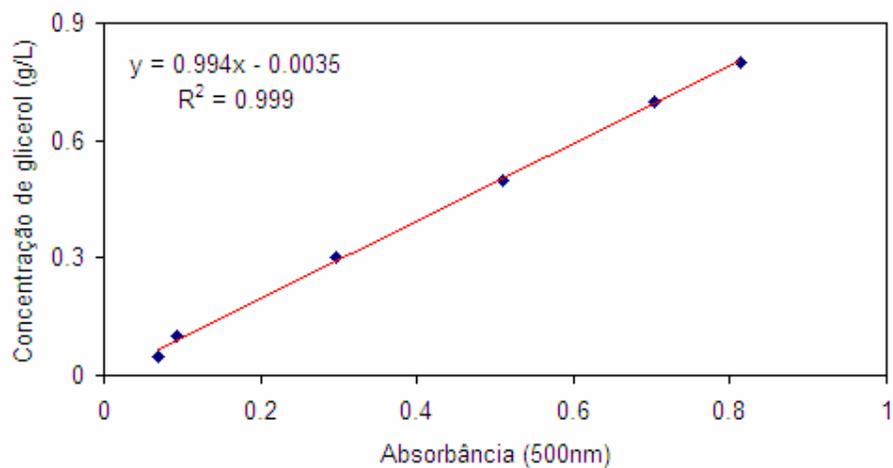


Figura 2C – Curva padrão para identificação da concentração de glicerol usada nas fermentações de 30 e 32°C.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

FELIPE SÁ ESMERALDO

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE
SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS* LAMI005**

**FORTALEZA
2010**