

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS - PPGTA

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MULTIVARIADA NA OBTENÇÃO,
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE
OBTIDO POR BIOREACÇÃO DO *Bacillus subtilis* ATCC 9372
UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

DISSERTAÇÃO

CAMPO MOURÃO

2018

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MULTIVARIADA NA OBTENÇÃO,
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIODERIVADO
OBTIDO POR BIOREAÇÃO DO *Bacillus subtilis* ATCC 9372
UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Trabalho de Dissertação apresentado como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Valderrama.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Mirela Vanin dos
Santos Lima.

CAMPO MOURÃO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M354o

Maroldi, Wédisley Volpato

Otimização e avaliação multivariada na obtenção, purificação e caracterização de biossurfactante obtido por bioreação do *Bacillus subtilis* ATCC 9372 utilizando melaço de cana-de-açúcar / Wédisley Volpato Maroldi – 2018.

68 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Patricia Valderrama

Coorientadora: Mirela Vanin dos Santos Lima

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Hidrólise. 2. Alimentos – Biotecnologia. 3. Alimentos – Dissertações. I. Valderrama, Patricia, orient. II. Lima, Mirela Vanin dos Santos, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219



TERMO DE APROVAÇÃO

OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO MULTIVARIADA NA OBTENÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE OBTIDO POR BIOREAÇÃO DO *Bacillus subtilis* ATCC 9372 UTILIZANDO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Por

WÉDISLEY VOLPATO MAROLDI

Essa dissertação foi apresentada às 14 horas, do dia 05 de Fevereiro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de produtos alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof(a). Dr(a). Patrícia Valderrama (Orientador(a) – PPGTA)

Prof(a). Dr(a). Luciana Maia (Membro Interno – PPGTA)

Prof(a). Dr(a). Carla Porto da Silva (Membro Externo – UTFPR)

* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que iluminou meu caminho durante esta caminhada, aos meus pais por darem todo o suporte possível e aos meus amigos e amigas pelo carinho em mim depositado nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus, por ter me guiado e iluminado durante todos os dias de minha vida e principalmente por ter me dado paciência e sabedoria para encarar os vários desafios para enfim alcançar mais esse objetivo.

Seguidamente agradeço a meus pais pelo apoio prestado incansavelmente, me dando ânimo e força, me direcionando e induzindo ao caminho certo, confiando e me apoiando nas decisões a serem tomadas.

Agradeço também à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Patrícia Valderrama por confiar no meu trabalho, empenho e me dar total apoio diante de dúvidas e questionamentos, se dispondo em auxiliar sempre que necessário, independente das circunstâncias.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Mirela Vanin dos Santos Lima por me auxiliar nas horas em que precisei e por me guiar diante dos problemas durante os experimentos.

As empresas pelos materiais cedidos utilizados nesse trabalho.

Aos amigos que aqui conquistei e certamente levarei para minha vida, que sempre estão do lado me fazendo rir e aprender com nossos erros.

Aos técnicos, estagiários, supervisores, porteiros, zeladores e jardineiros pelos serviços prestados e diálogo com os estudantes, se tornando acessíveis e prestativos diante de qualquer coisa.

Por fim, agradeço imensamente a todos os professores que contribuíram em minha pós-graduação, com sabedoria e principalmente pela exigência necessária para formar verdadeiros profissionais, e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná por ser acessível aos acadêmicos e pela qualidade de ensino e conforto prestado no decorrer do tempo aqui passado.

RESUMO

Ao longo dos anos e de inúmeras pesquisas na área biotecnológica os biossurfactantes começaram a ser sintetizados por uma gama de microrganismos que, atuando sobre uma fonte de carbono, e auxiliado por uma fonte de nitrogênio e minerais, produzem compostos com características superiores quando comparados aos surfactantes. O uso destes tem sido ampliado, porém o custo produtivo dos biossurfactantes ainda é alto quando comparado aos surfactantes sintéticos. Nesse sentido, pesquisas que contribuam para a melhoria do bioprocessamento de produção dos biossurfactantes se fazem necessárias. Neste trabalho, as ferramentas quimiométricas de planejamento experimental multivariado foram de fundamental importância para acelerar e otimizar as condições experimentais. O planejamento Doehlert auxiliou na otimização do tipo do ácido e suas melhores condições experimentais para a hidrólise do melaço de cana-de-açúcar. Os resultados apontaram que o ácido sulfúrico 10% com um tempo de reação de 60 minutos proporciona um aumento na concentração de açúcares redutores. A etapa de clarificação do melaço hidrolisado (MH) foi otimizada através de planejamento fatorial 2^2 . Os clareamentos utilizando subacetato de chumbo e ultrafiltração foram considerados na etapa de produção do biosurfactante. Ao longo do bioprocessamento observou-se a formação crescente do biosurfactante e uma redução na quantidade de açúcares redutores disponíveis. Uma avaliação estatística mostrou diferença significativa no início do bioprocessamento realizado a partir do MH clarificado com subacetato de chumbo e a partir do MH clarificado por ultrafiltração. Entretanto, a diferença não é estatisticamente significativa, no nível de 99%, ao final da bioreação. A PCA, aplicada com a fusão dos dados de espectroscopia NIR e resultados laboratoriais para biomassa, produto, proteína e açúcar redutor, ao longo da bioreação, permitiu explorar de forma mais objetiva o bioprocessamento. Foi possível inferir sobre a formação de biosurfactante até o tempo de 108 horas de bioreação quando ocorre uma estabilização no bioprocessamento. Além disso, até o tempo de 60 horas de bioreação as variáveis que apresentam maior influência no bioprocessamento são o açúcar redutor e as absorções na região do NIR correspondente ao segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃ e ArOH entre 1200 – 1400 nm e, ao primeiro overtone da ligação ArCH em torno de 1600 nm. Após 72 horas de bioprocessamento as variáveis que mais influenciam a bioreação são a biomassa e o produto. Tais variáveis estão correlacionadas com as regiões do NIR entre 900 -1100 nm (absorção do terceiro overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e ArCH) e 1400 -1500 nm (absorções do segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, CONHR, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e CONH₂). O borbulhamento realizado em 3 etapas aumentou a concentração de produto e apresentou diferença estatística significativa, no nível de 95%, no teste de Tukey.

Palavras-chave: Biosurfactante, melaço de cana-de-açúcar, hidrólise ácida, planejamento experimental, NIR, PCA.

ABSTRACT

Over the years and numerous researches in the biotechnology area biosurfactants began to be synthesized by a range of microorganisms that, acting on a carbon source, and aided by a source of nitrogen and minerals, produce compounds with superior characteristics when compared to synthetic surfactants. Its uses have been expanded, but the production cost of biosurfactants is still high when compared to synthetic surfactants. In this sense, research that contributes to the improvement of bioprocess production of biosurfactants is necessary. In this work, the chemometric tools of multivariate experimental design were of fundamental importance to optimize the experimental conditions. The Doehlert experimental design contributed in the optimization of the acid type and its experimental conditions for the hydrolysis of sugarcane molasses. The results indicated that 10% sulfuric acid with a reaction time of 60 minutes provides an increase in the concentration of reducing sugars. The clarification step of hydrolyzed molasses (MH) was optimized through factorial design 2^2 . Clarification using lead subacetate and ultrafiltration were considered in the biosurfactant production stage. Throughout the bioprocess the growing formation of the biosurfactant and a reduction in the amount of reducing sugars were observed. A statistical evaluation showed a significant difference at the beginning of the bioprocess made from MH clarified with lead subacetate and from MH clarified by ultrafiltration. However, the difference is not statistically significant, at the 99% level, at the end of the bioreaction. PCA, applied to data fusion of NIR spectroscopy and laboratory results for biomass, product, protein and reducing sugar, allowed to explore the bioprocess in a more objective way. It was possible to infer about the formation of biosurfactant until the time of 108 hours of bioreaction when a stabilization occurs in the bioprocess. Moreover, until 60 hours of bioreaction, the variables that have the significant influence on the bioprocess are the reducing sugar and absorptions in the NIR region corresponding to the second overtone of the CH, CH₂, CH₃, and ArOH between 1200-1400 nm, and to the first overtone of the ArCH around 1600 nm. After 72 hours of bioprocess, the variables that most influence bioreaction are biomass and the product. These variables are correlated with NIR regions between 900-1100 nm (absorption of the third overtone of CH, CH₂, CH₃, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ and ArCH) and 1400-1500 nm (absorptions of the second overtone of CH bonds CH₂, CH₃, CONHR, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ and CONH₂). The bubbling performed in 3 steps increased the product concentration and presented a statistically significant difference, at the 95% level, in the Tukey test.

Keywords: Biosurfactant, sugarcane molasses, acid hydrolysis, experimental design, NIR, PCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo de uma emulsão	17
Figura 2 - Esquema demonstrativo quanto a dissociação da molécula surfactante.	19
Figura 3 - Esquema ilustrativo do bioprocesso e seus agentes produtores e produtos.	21
Figura 4 - Esquema produtivo de uma usina sucroalcooleira.	24
Figura 5 - Estrutura da principal isoforma da surfactina.	28
Figura 6 - Reação de redução do íon cobre para óxido de cobre I.....	32
Figura 7 – Ilustração do redutímetro e a visualização do ponto de viragem.....	32
Figura 8 - Gráfico dos efeitos <i>versus</i> valor de z para o planejamento Doehlert.	34
Figura 9 – Gráficos de contorno. (A) Efeito do HCl. (B) Efeito do H ₃ PO ₄ . (C) Efeito do H ₂ SO ₄	35
Figura 10 - Gráfico de contorno na otimização da clarificação do melão hidrolisado a partir do sistema de ultra e microfiltração.....	42
Figura 11 – Gráfico de contorno na otimização da clarificação do melão hidrolisado a partir do sub-acetato de chumbo.	44
Figura 12 - Esquema ilustrativo do procedimento de ativação e preparo do inóculo do microrganismo.....	47
Figura 13 - Esquema ilustrativo da coleta de amostras para a análise dos borbulhamentos aplicados.....	53
Figura 14 - Resultados observados.....	55
Figura 15 - Curva de calibração para quantificação do chumbo por absorção atômica em chama.....	55
Figura 16 - Resultados analíticos do Bioprocesso.....	57
Figura 17 - Elipse de confiança.	58
Figura 18 – Scores do PCA.	60
Figura 19 - <i>Loadings</i> do PCA.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos produtores e biosurfactantes produzidos por eles.	22
Tabela 2 - Composição centesimal do melaço de cana-de-açúcar.....	24
Tabela 3 - Planejamento experimental Doehlert.	31
Tabela 4 - Matriz de experimentos do planejamento experimental Doehlert para a hidrólise ácida. Valores entre parênteses corresponde à variável codificada.	33
Tabela 5 - Experimentos realizados a partir da análise dos gráficos de contorno utilizando os ácidos clorídrico e sulfúrico.	36
Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^2 , sendo X_1 e X_2 as variáveis independentes.....	40
Tabela 7 - Resultados do planejamento fatorial 2^2 na clarificação do substrato hidrolisado a partir do sistema de ultra e microfiltração. Valores entre parênteses correspondem as variáveis codificadas.....	41
Tabela 8 – Resultados do planejamento fatorial 2^2 na clarificação do substrato hidrolisado a partir do sub-acetato de chumbo. Valores entre parênteses correspondem as variáveis codificadas.....	43
Tabela 9 – Resultados obtidos empregando-se as condições otimizadas através do planejamento 2^2 para a clarificação do melaço hidrolisado a partir do sub-acetato de chumbo.....	44
Tabela 10 - Resultados para quantificação do chumbo.	56
Tabela 11 - Pontos para a obtenção do FCC para cálculo de concentração de nitrogênio.....	57
Tabela 12 - Fatores teóricos obtidos pelo bioprocessamento.....	62
Tabela 13 - Resultados do procedimento de borbulhamento.....	62
Tabela 14 - Teste de Tukey com $\alpha=0,05$	63

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.2. OBJETIVOS.....	15
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	15
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.3.1. CLASSIFICAÇÃO	17
1.3.2. BIOSURFACTANTES	20
1.3.3. OBTENÇÃO DOS BIOSURFACTANTES.....	20
1.3.4. MELAÇO.....	23
1.3.5. HIDRÓLISE DO MELAÇO.....	25
1.3.6. CLAREAMENTO DO MELAÇO.....	25
1.3.7. FONTE PROTEICA.....	26
1.3.8. A SURFACTINA	27
CAPÍTULO 2- HIDRÓLISE ÁCIDA	29
2.1. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
2.3. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	37
CAPÍTULO 3- CLARIFICAÇÃO DO SUBSTRATO	39
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.2. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	40
3.2.1. CLARIFICAÇÃO DO SUBSTRATO UTILIZANDO O ULTRAFILTRAÇÃO.....	41
3.2.2. CLARIFICAÇÃO DO SUBSTRATO UTILIZANDO O SUB-ACETATO DE CHUMBO .	43
3.3. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	45
CAPÍTULO 4- PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	46

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1.1. PREPARO DO INÓCULO	47
4.1.2. REMOÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CHUMBO	48
4.1.3. BIOPROCESSO	48
4.1.3.1 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DO CALDO FERMENTADO	49
4.1.3.1.1 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA (MASSA CELULAR SECA)	49
4.1.3.1.2 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO	49
4.1.3.1.3 ESPECTROSCOPIA NIR	50
4.1.3.1.4 DETERMINAÇÃO DE AR	50
4.1.3.1.5 DETERMINAÇÃO DE PRODUTO FORMADO (BIOSURFACTANTE SECO).....	50
4.1.3.2 CÁLCULO DOS FATORES DE CONVERSÃO E PRODUTIVIDADE.....	51
4.1.3.2.1 - FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM PRODUTO (G/G).....	51
4.1.3.2.2 - FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS (G/G)	52
4.1.3.2.3 PRODUTIVIDADE	52
4.1.4. BORBULHAMENTO.....	53
4.2. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	53
4.2.1. PREPARO DO INÓCULO	53
4.2.2. REMOÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CHUMBO	54
4.2.3. BIOPROCESSO	56
4.2.3.1 CÁLCULO DOS FATORES DE CONVERSÃO E PRODUTIVIDADE.....	61
4.2.4. BORBULHAMENTO	62
4.3. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO	63
CAPÍTULO 5.....	65
5.1. CONCLUSÃO GERAL	66
5.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

Surfactantes são agentes redutores da tensão superficial entre duas fases distintas quanto a sua polaridade. Estes agentes tem a propriedade de se incorporar na interface de uma mistura heterogênea e, por possuírem caráter anfifílico, tende a formar micelas, reduzindo assim a atividade repulsiva com o agente dissolvente. Tais compostos podem ser polímeros, compostos de cadeia longa e complexa, ou substâncias similares ao sabão, que são moléculas pequenas e anfifílicas com uma parte hidrofóbica, constituída por uma cadeia alifática, e uma parte hidrofílica, que pode ser constituída por uma grande variedade de constituintes, como carboidratos e algumas proteínas. Com tais características, o surfactante é potencialmente utilizado como agente emulsificante, reduzindo a tensão superficial, acrescentando aos líquidos imiscíveis uma maior solubilidade, mobilidade, biodisponibilidade e, conseqüentemente, uma degradação da parte hidrofóbica ou insolúvel de compostos orgânicos (DAMODARAN; PARKIN; OWEN, 2010).

Desde 1921 os surfactantes são utilizados em produtos alimentícios, contudo seu uso somente se intensificou após a ampliação da escala na produção destes, obtendo-se uma maior pureza e reduzindo-se a sua toxicidade. Algumas indústrias verificaram uma melhora na qualidade de seus produtos ou nas características marcantes destes, por exemplo em panificação, onde verificou-se que seu uso proporcionava ao pão um interior macio. Nas indústrias produtoras de margarina a adição de surfactantes proporcionou uma melhora significativa na emulsão e um produto mais consistente. No tratamento de efluentes, os surfactantes atuam como agente de separação de fases líquida e sólida (YOUSSEF et al., 2004; KROG, 1981).

Os surfactantes são obtidos, em sua maioria, pela derivatização do petróleo, contudo, ao longo dos anos e de inúmeras pesquisas na área biotecnológica, iniciou-se a produção dos biossurfactantes, que podem ser sintetizados por uma série de microrganismos que atuando sobre uma fonte de carbono e, auxiliado por uma fonte de nitrogênio e minerais, produzem compostos com características idênticas e até melhores quando comparados aos surfactantes (DAMODARAN, PARKIN, FENNEMA, 2010; JOSHI et al., 2008). Deste modo houve um aumento expressivo no interesse pelos biossurfactantes de origem microbiológica, que possuem como características como a biodegradabilidade e baixa toxicidade (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Diante do amplo uso dos surfactantes na indústria alimentícia e das características notadas nos biosurfactantes, evidenciou-se que o uso dos biosurfactantes pode ser potencializado na área alimentícia. Entretanto, o custo para a produção de biosurfactantes, nas condições ideais, torna-se o principal obstáculo. A aquisição de uma fonte de carboidrato, nitrogênio e minerais sintéticos quando submetidos às condições ideais de pH, temperatura e pressão tornam-se de alto custo. O microrganismo também é de fundamental importância, principalmente ante a agentes contaminantes e interferentes que possam afetar o bioprocesso, como o ferro, alumínio e o chumbo. Outro fator importante é a purificação do biosurfactante obtido, utilizando solventes para a separação deste do meio líquido. Todos esses fatores inviabilizam o processo, do ponto de vista econômico, devido ao seu alto custo para as indústrias, que buscam a melhor característica dos seus produtos alinhado a redução dos custos de processamento e matérias-primas (MAKKAR, R.; CAMEOTRA, 2002; YOUSSEF *et al.*, 2004).

Com uma produtividade de biosurfactante, ao longo dos inúmeros estudos realizados até o momento, o bioprocesso necessita de novas pesquisas a fim de determinar suas melhores condições para que ocorra uma alta produtividade e, conseqüentemente, maior rendimento. Contudo o bioprocesso só pode acontecer nas condições ideais, conforme citado anteriormente, obedecendo tanto a legislação vigente, quanto as condições ideais para o microrganismo (ABOUSEOUD; AMRANE, 2008; JOSHI *et al.*, 2008).

Estudos realizados com o melaço da cana-de-açúcar, resíduo rico em açúcares proveniente das usinas açucareiras, apontaram que seu uso alinhado a uma fonte de nitrogênio torna-se um potencial substrato para o bioprocesso, assim reduzindo o custo produtivo para a obtenção dos biosurfactantes (JOSHI *et al.*, 2008). Entretanto, o uso do melaço necessita de alguns procedimentos antes da bioreação, como indicado pela CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) nº 12/78 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Para a utilização do melaço como substrato em processos fermentativos este deve passar por um pré-tratamento afim de remover interferentes que possam afetar tanto o bioprocesso quanto estarem presentes no produto da reação, tal processo é chamado de clareamento ou clarificação (ANVISA, 1978). Além deste pré-tratamento alguns casos específicos requerem que o açúcar presente no substrato, normalmente dissacarídeos ou polissacarídeos, sejam hidrolisados em açúcares mais simples (como os

monossacarídeos) devido a incapacidade de alguns microrganismos em metabolizar açúcares mais complexos para produção do biossurfactante. Ainda, quando determinados microrganismos utilizam um açúcar mais simples as taxas produtivas são amplificadas significativamente (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

Diante da variedade de microrganismos e produtos obtidos pela bioreação destes com uma fonte nutricional favorável, tem-se também uma vasta aplicação. Destaque, por exemplo, na indústria alimentícia aumento da maciez no interior do pão, melhora significativa da emulsão produzindo um produto mais consistente (KROG, 1981; YOUSSEF *et al.*, 2004); Na indústria de cosméticos: redução dos impactos ambientais causados pelo descarte residual (MORAIS; ANGELIS, 2012); Na indústria farmacêutica: inibição da formação de coágulos, atividade anti-microbiológica e antitumoral (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Bacillus subtilis, tem se destacado, visto que o biossurfactante por ele produzido possui propriedades tensoativas, como a surfactina (NITSCHKE; PASTORE, 2006) Com o emprego desse microrganismo, após a bioreação, o biossurfactante fica solubilizado na fase aquosa, necessitando assim de um agente de separação específico. Alguns estudos demonstram que o uso de bolhas de ar aumenta a concentração destes agentes nas superfícies, aumentando, conseqüentemente, a produtividade do processo. Outros estudos indicaram que o uso de um álcool, como o metanol ou o etanol, alinhado a baixa temperatura realizam tal procedimento com eficácia (KATSURAGI; TANI, 1997; ALVES; SANTANA; SOARES, 2013).

Diante do exposto, torna-se interessante e importante um estudo para otimizar o processo de obtenção e purificação de biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 9372 a partir do melaço da cana-de-açúcar. Nesse sentido, métodos quimiométricos de otimização multivariada podem colaborar extensamente nas etapas prévias à geração propriamente dita do biossurfactante. Da mesma forma, métodos de reconhecimento de padrão não supervisionado podem auxiliar a avaliação dos resultados nas etapas de caracterização e purificação do biossurfactante que será produzido (FERREIRA *et al.*, 2004; FERREIRA, 2015).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar as condições do bioprocesso utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 9372 como biocatalisador e o melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, a fim de obter através da técnica de borbulhamento combinado a purificação etanólica, um biossurfactante com alto grau de pureza.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições para a realização da hidrólise do melaço de cana-de-açúcar através de planejamento experimental;
- Otimizar as condições do preparo do substrato a partir do melaço de cana-de-açúcar empregando planejamento experimental;
- Obter o biossurfactante através da fermentação em erlenmeyers;
- Acompanhar do processo fermentativo através de métodos convencionais e espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) e Análise de Componentes Principais (PCA);
- Purificar o biossurfactante obtido utilizando a técnica do borbulhamento alinhado à purificação etanólica;
- Avaliar a efetividade do processo de borbulhamento afim de obter a melhor metodologia, com o auxílio de técnicas estatísticas;

1.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com o aumento da demanda de mercado e a crescente busca de produtos que sejam saudáveis e naturais, o ramo de molhos, maioneses, margarinas e produtos derivados de óleo fizeram uma grande investida na procura de componentes naturais que possam oferecer características idênticas aos produtos sintéticos, com melhores informações nutricionais e características que agradem o consumidor (MOSCON *et al.*, 2010; PAULA *et al.*, 2004; STAHL, 2015).

Atualmente existem uma infinidade de compostos capazes de unir duas fases com polaridades distintas e formar, de modo simplificado e estável, uma nova fase chamada emulsão. Uma emulsão consiste na união de uma fase polar à uma apolar, gerando características mais adequadas, como alteração de textura, cor, opacidade e sabor (DANVIRIYAKUL *et al.*, 2002; TCHOLAKOVA; DENKOV; LIPS, 2008). As

emulsões são de extrema importância para as indústrias do ramo alimentício, pois possibilitam gerar produtos com uma maior estabilidade e com um maior tempo de vida de prateleira (ROSSI *et al.*, 2006; TCHOLAKOVA; DENKOV; LIPS, 2008).

1.3.1. CLASSIFICAÇÃO

Muitos autores classificam os emulsificantes quanto à sua distribuição de fases e da carga presente quando são dissociados em água. A distribuição de fases é definida quanto as fases dispersas e dispersantes de uma emulsão. Quando a fase dispersa é de caráter lipofílico tem-se uma emulsão óleo em água (O/A) e quando a fase dispersa é de caráter hidrofílico tem-se uma emulsão água em óleo (A/O), conforme a figura 1 (BINKS, 2002).

Figura 1 – Esquema representativo de uma emulsão



Fonte: Adaptado de Binks (2002).

Nota: À esquerda o esquema representativo de emulsão com um agente intermediador ar/óleo em água (O/W); à direita temos o esquema representativo de emulsão com um agente intermediador água em ar/óleo (W/O).

Quanto a classificação por cargas tem-se dois grupos:

- Emulsificantes iônicos: são responsáveis por estabilizarem emulsões tipo O/W, onde os grupos apolares do emulsificante interagem com as gotículas de óleo enquanto os grupamentos carregados positivamente se projetam para a fase aquosa evitando que outros glóbulos de óleo interajam com o composto (SOBRINHO, 2007);
- Emulsificantes não iônicos: são orientados na superfície das gotículas do óleo com a porção polar projetada para a fase aquosa (BUENO, 2008).

Dentre os inúmeros tipos de emulsificantes disponíveis no mercado, vale destacar os mais utilizados comercialmente em alimentos:

- Lecitina: mistura complexa que contém aproximadamente 65-75% de fosfolipídios e triglicerídeos, obtida a partir de uma purificação do extrato da soja e, com a capacidade de emulsionar duas fases distintas e manter constantes suas propriedades ao longo do tempo. Amplamente utilizada na indústria alimentícia com custo reduzido, seu uso vem sendo amplificado em rações animais e também na agropecuária. Contudo, a lecitina, caso não seja de alto grau de pureza, acarretará grandes modificações na estrutura e sabor do alimento, descaracterizando o produto e suas funções nutricionais (CALVO *et al.*, 2011; CASTEJON, 2010; FOROUZANFAR *et al.*, 2010; SCHOLFIELD, 1981);
- Ésteres: Uma infinidade de ésteres vem sendo produzidos ao longo dos anos afim de fazer frente à grande demanda da lecitina comercial. Por não serem estáveis ao longo da reação de esterificação, os ésteres são pouco difundidos e, em sua maioria, não permitidos pela FDA (*Food and Drug Administration*). Um tipo de éster permitido pela FDA é o monoéster de propilenoglicol, obtido na esterificação de poligliceróis com ácidos graxos ou interesterificação com triglicerídeos. Como o pH e a temperatura reacional devem ser controladas, devido à formação de compostos indesejáveis, o seu uso fica restrito, pois tal pode causar modificações indesejáveis, principalmente em alimentos (JÄGER, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2004; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; STAHL, 2015);
- Surfactantes: São moléculas que agem na interface de uma mistura imiscível (líquido-líquido ou ar-líquido), reduzindo a tensão entre as superfícies e ocasionando a emulsão entre as fases. Podem ser obtidos por via sintética ou biossintetizados, sendo que pela segunda rota é possível obter um produto biodegradável e com resultados significativamente melhores quanto à estabilidade da emulsão e a aplicabilidade em alimentos, como em pães e margarinas, e também no tratamento de efluentes (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; BINKS, 2002; DESAI; BANAT, 1997; HOMMA; ARIMOTO; MISATO, 1981).

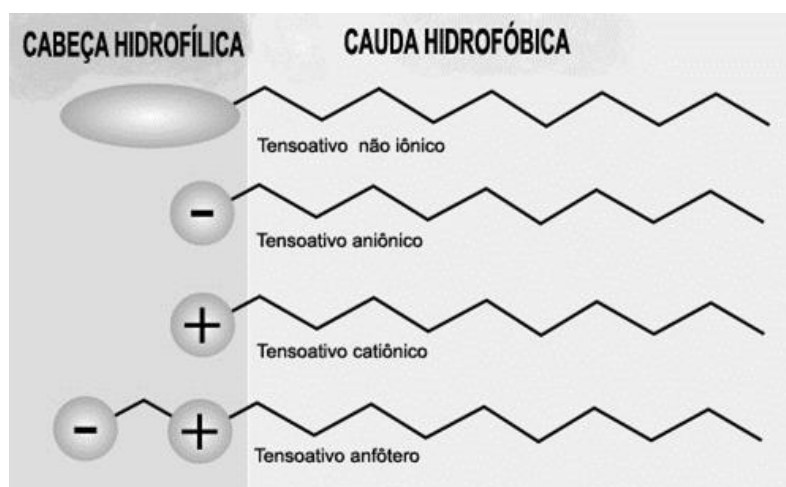
Diante da intensa pesquisa afim de substituir a lecitina (e outros produtos comerciais) para obter produtos com melhores características, os surfactantes vem ganhando espaço devido às suas propriedades e formas de obtenção, fornecendo melhores resultados tanto na aplicação quanto na aceitação sensorial (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; DESAI; BANAT, 1997).

Assim como os emulsificantes, os surfactantes são classificados quanto ao seu arranjo hidrófilo e características da sua estrutura hidrofóbica. A classificação quanto ao arranjo hidrófilo é verificada quando o surfactante é submetido a um sistema

aquoso, sendo assim possível avaliar a solubilidade da parte polar quando ocorre a dissociação da molécula, conforme descrita pela figura 2, e classificada como:

- Aniônico: O hidrófilo é carregado negativamente, como os grupos carboxil, sulfonato, sulfato ou o fosfato;
- Catiônico: O hidrófilo é carregado positivamente, como os halogenetos;
- Não-lônico: O hidrófilo não possui carga, como os polioxietilenos e açúcares;
- Anfótero: O hidrófilo contém, ou pode conter, tanto uma carga negativa quanto uma carga positiva, como as sulfobetáínas (MYERS, 2014).

Figura 2 - Esquema demonstrativo quanto a dissociação da molécula surfactante.



Fonte: Adaptado de Myers (2014).

Quanto às características de sua estrutura hidrofóbica, avalia-se o surfactante quanto ao tamanho de sua cadeia:

- Grupos alquil de cadeia linear longa;
- Grupo alquil de cadeia ramificada;
- Grupo alquenil não saturado;
- Alquilbenzeno;
- Alquilnaftaleno;
- Grupos fluoroalquil;
- Polidimetilsiloxanos;
- Derivados de polioxipropilenoglicol;
- Biosurfactantes (MYERS, 2014).

1.3.2. BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes começaram a receber atenção devido à possibilidade de sua obtenção através de uma fonte renovável, possuindo um grande potencial para uso em fármacos, na indústria alimentícia e na indústria petroquímica, dentre outras. Podem ser produzidos e purificados a partir de microrganismos, podendo apresentar estrutura variável, porém com mesmo caráter anfifílico dos demais surfactantes, estando sujeito aos nutrientes no qual foram submetidos durante a fermentação. Desta forma, o estudo para produção de um biosurfactante é complexo e minucioso (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; KATSURAGI; TANI, 1997; MARIM, 2014).

Dentre os vários fatores que afetam a produção de um biosurfactante, o que mais se destaca é o custo produtivo quando comparado aos demais tipos de surfactantes. Entretanto, para que a produção seja mais rápida e eficiente, diferentes fatores devem ser levados em consideração:

- O controle dos fenômenos superficiais e interfaciais do biossurfactante;
- As propriedades estruturais e o controle de suas reações;
- As propriedades físicas e químicas (MYERS, 2014).

Com isso outros fatores distinguem os biossurfactantes dos demais surfactantes, como:

- A compatibilidade química ou biológica ao sistema a ser empregado;
- A baixa toxicidade;
- A ausência de reações alergênicas quanto ao seu uso em humanos;
- O baixo impacto ambiental;
- A aceitação pública: “natural” *versus* “sintético”(MYERS, 2014).

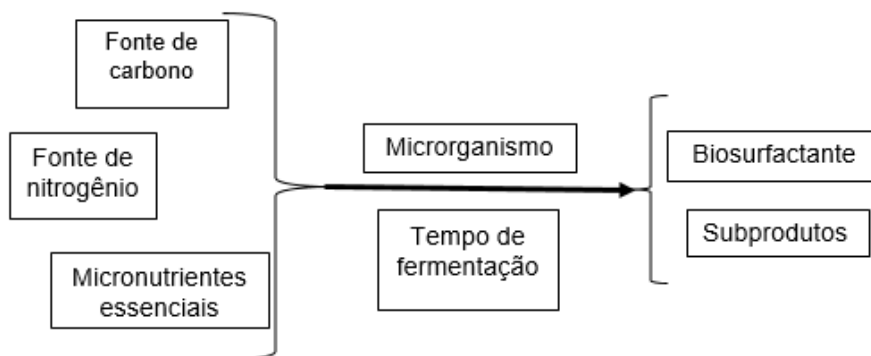
Os biossurfactantes vem sendo mundialmente utilizados e produzidos de modo a garantir a segurança tanto alimentícia quanto ambiental, revolucionando a forma de tratamento de efluentes e também a quantidade de material necessário para a formação de emulsões mais estáveis e com um maior grau de pureza (BARROS; PASTORE; QUADROS, 2008; BERTON; GENOT; ROPERS, 2011).

1.3.3. OBTENÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

A obtenção dos biossurfactantes ocorre através da bioreação de um microrganismo sobre uma fonte de carbono com a adição de macro e micronutrientes,

sob condições específicas de cada agente produtor, conforme descrito na figura 3. Condições como pH, temperatura, concentração de sais e aeração são fatores que merecem atenção na produção do biosurfactante (ABOUSEOUD; AMRANE, 2008; BARROS; PASTORE; QUADROS, 2008; DESAI; BANAT, 1997; JOSHI *et al.*, 2008; KATSURAGI; TANI, 1997; MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

Figura 3 - Esquema ilustrativo do bioprocesso e seus agentes produtores e produtos.



Fonte: Adaptado de Makkar e Cameotra (1997).

Os microrganismos podem atuar sobre as fontes de carbono, nitrogênio e micronutrientes essenciais para a produção de biosurfactantes com estruturas distintas, mas com funções similares (ABOUSEOUD; AMRANE, 2008; BUENO, 2008; PIRÔLLO, 2006). Com isso alguns microrganismos vêm sendo amplamente estudados quanto à sua produção atuando em fontes disponibilizadoras de nutrientes essenciais, como carbono e nitrogênio, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Microrganismos produtores e biosurfactantes produzidos por eles.

Microrganismo	Biosurfactante produzido
<i>Bacillus</i> sp.	Surfactina, Subtilisina
<i>Acinetobacter</i> sp.	Fosfolipídios, Alasan, Emulsan, Biodispersan
<i>Rhodococcus</i> sp.	Micolatos de trealose, Ésteres de trealose,
<i>Corynebacterium</i> sp.	Micolados de mono-di e trissacarídios, Fosfolipídeos
<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipopeptídios
<i>Candida</i> sp.	Soforolipídios, Liposan
<i>Serratia</i> sp.	Ramnolipídios, Serrawetina

Fonte: Adaptado de Araujo; Freire; Nitschke (2013); Colla; Hemkemeier; Gil (2012); Marim (2014).

Apesar das possibilidades e aplicações possíveis de um biosurfactante sua produção ainda necessita de muitos estudos dado o seu alto custo e dificuldade produtiva. O custo para manutenção do bioprocessamento ou as condições para que isto aconteça não são favorecidas, seja por falta de pesquisas ou pelo não interesse comercial (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SOBRINHO, 2007). Vale salientar algumas condições que desfavorecem a produção dos biosurfactantes:

- O meio de cultura sintético ideal utilizado ser de custo elevado;
- Os nutrientes necessários para a produção do biosurfactante possuírem um custo excedente;
- A recuperação e purificação do biosurfactante ser dificultada, sendo assim necessário o uso de substâncias ou metodologias alternativas (BARROS; PASTORE; QUADROS, 2008; MOSCON *et al.*, 2010; NITSCHKE; PASTORE, 2006; NITSCHKE; PASTORE, 2002; VALDUGA *et al.*, 2007).

Como solução para o meio de cultura sintético uma elevada quantidade de resíduos industriais vem sendo empregada como fonte nutritiva para que os microrganismos possam agir e assim produzir o biosurfactante. Dentre os vários meios de cultura sendo utilizados alguns se destacam pela disponibilidade de nutrientes e melhor adaptação de microrganismos quando submetidos à fermentação. São eles:

- Efluentes do processamento de batatas: líquido de cor marrom límpido rico em amido, açúcares, nitrogênio e minerais. Algumas espécies de microrganismos, como *Bacillus* sp. e *Rhodococcus* sp., são capazes de degradar e ter uma alta produção de biosurfactantes (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; MENESES, 2016);
- Manipueira: líquido de cor amarelada após a prensagem da mandioca na produção de farinha. Rico em açúcares e sais minerais, que são essenciais

para rotas biotecnológicas envolvendo microrganismos como *Acinetobacter* sp. e *Bacillus* sp, que são capazes de produzir biosurfactantes (BUENO, 2008);

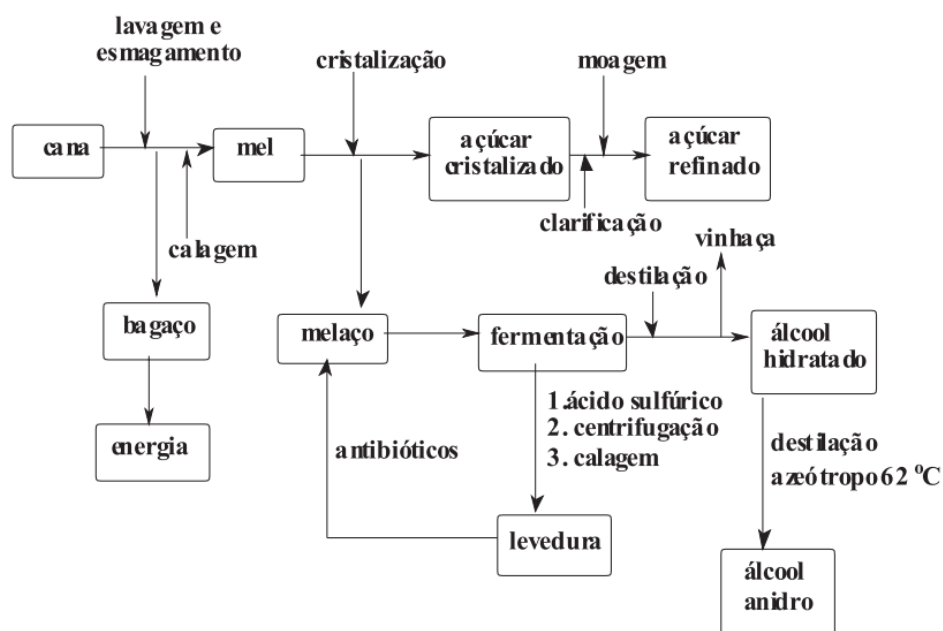
- Soro de queijo: subproduto obtido após a prensagem de produtos oriundos do leite, como o queijo. Resíduo rico em lactose, proteínas, ácidos orgânicos e vitaminas, componentes essenciais para a ação de algumas espécies de *Bacillus* (CARVALHO *et al.*, 2008);
- Melaço da cana-de-açúcar: O melaço da cana-de-açúcar proveniente da usina de açúcar e álcool vem sendo amplamente estudado devido às suas características que são similares às do meio sintético, favorecendo as condições ideais de nutrientes ao bioprocessamento (MARIM, 2014; PAULA *et al.*, 2004; VALDUGA *et al.*, 2007).

1.3.4. MELAÇO

Dentre os meios alternativos, vários autores descrevem que o melaço é o mais empregado devido às condições nutricionais essenciais para a maioria dos microrganismos e também ser de fácil utilização e que, ao esterilizar, não perde seus nutrientes e mantém suas características até o fim das bioreações (HAULY; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003; MARIM, 2014; VALDUGA *et al.*, 2007).

O melaço é obtido após a cristalização do mel, dentro do processo produtivo de uma indústria sucroalcooleira, podendo ser enviado para a produção de álcool após alguns pré-processamentos, tal processo está descrito na figura 4 (RODRIGUES, 2011).

Figura 4 - Esquema produtivo de uma usina sucroalcooleira.



Fonte: Adaptado de Rodrigues (2011).

O melaço da cana-de-açúcar tem inúmeras substâncias presentes que podem afetar o bioprocessamento, conforme descrito na tabela 2. Além disso, alguns microrganismos não são capazes de degradar/metabolizar o açúcar na forma de sacarose, necessitando assim de uma reação capaz de transformá-los em sua forma de açúcares redutores, glicose/frutose (VALDUGA *et al.*, 2007). Como solução para isso faz-se necessário hidrolisar o melaço, que pode ser ácida ou enzimática. A via enzimática, além de necessitar de condições específicas de pH e temperatura, possui um custo elevado e produz resultados iguais ou inferiores à via ácida. Deste modo a via ácida faz-se mais viável, do ponto de vista econômico (HAULY; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003; PAULA *et al.*, 2004; SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009).

Tabela 2 - Composição centesimal do melaço de cana-de-açúcar.

Composição	Concentração (g%)
Nitrogênio	0,58 p/v
Fósforo	0,015 p/v
Potássio	1,63 p/v
Umidade	9,1 p/v
Cinzas	9,98 p/p
Glicídios redutores em glicose	14,72 p/p
Glicídios não redutores em sacarose	33,78 p/p

Fonte: Adaptado de Feltrin e colaboradores (2000).

1.3.5. HIDRÓLISE DO MELAÇO

A hidrólise ácida produz uma reação exotérmica, agindo sobre a sacarose e produzindo glicose/frutose. Tal procedimento é amplamente utilizado tanto em indústrias como na pesquisa, com resultados expressivos quanto à formação dos açúcares redutores (FERREIRA *et al.*, 2013; VALDUGA *et al.*, 2007). Alguns ácidos como H_2SO_4 , HCl e H_3PO_4 vem sendo empregados demonstrando grande eficácia na hidrólise em diversos meios (HAULY; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003; JUNIOR, 2012; VALDUGA *et al.*, 2007).

Após a hidrólise, a legislação brasileira exige que, para utilização do melaço em um processo fermentativo, uma remoção de substâncias que possam ser tóxicas ao ser humano, como as melanoidinas que são oriundas do processamento na usina sucroalcooleira, deve ser realizada, conforme a CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) nº 12/78 da ANVISA. Segundo tal norma, o melaço é definido como líquido residual de indústria de açúcar cristalizado com coloração escura que, para ser utilizado como meio fermentativo, deve ser clarificado, para que não haja interferentes diretos que possam afetar o bioprocessamento (ANVISA, 1978; VALDUGA *et al.*, 2007).

1.3.6. CLAREAMENTO DO MELAÇO

O clareamento do substrato consiste em remover substâncias que causam o escurecimento e turbidez do meio, como por exemplo cinzas, metais, subprodutos reacionais e corantes naturais. Deste modo a indústria vem utilizando alguns métodos tradicionais e outros mais avançados. Um dos métodos utilizados laboratorialmente que gera uma eficácia significativa é o uso do sub-acetato de chumbo II, ou sal de Horne (sub-acetato de chumbo) (CAROCODEL *et al.*, 2010). Como o uso de reagentes que contenham chumbo é inviável na indústria alimentícia, após a clarificação usando o sub-acetato de chumbo, deve-se realizar a remoção deste do meio reacional. Industrialmente o sub-acetato é utilizado em métodos analíticos, apresentando um ótimo resultado na clarificação. Alguns trabalhos descreveram seu uso variando a quantidade a ser adicionada e o tempo a qual o sistema é agitado (CAROCODEL *et al.*, 2010).

Outro método utilizado para a clarificação e remoção de substâncias indesejadas de meios ricos em açúcares são a microfiltração e a ultrafiltração. A microfiltração retém partículas com tamanhos superiores à 0,05 μm e é amplamente utilizada no ramo alimentício, como na clarificação de sucos. A ultrafiltração retém partículas com tamanhos superiores e é usada, principalmente, em tratamento de efluentes onde possibilita uma retenção molecular de até 0,001 μm (FAPPI, 2015; PAULA *et al.*, 2002).

Contudo muitos trabalhos descreveram a inviabilidade da micro e ultrafiltração perante uma matriz muito complexa, onde pode ocorrer a retenção de compostos que são desejáveis ao produto ou processo. O filtro que retém as substâncias que não são desejáveis, pode atuar mediante uma redução ou aumento de pressão, sob determinado pH e temperatura, alternando assim a sua permeabilidade e, em casos extremos de pressão, temperatura e pH, um rompimento do filtro ou alargamento das redes estruturais pode ser observado. Com isso ao se fixar a temperatura e o pH do meio a ser utilizado, temos como variáveis independentes a pressão exercida sobre o filtro e o tipo de filtro utilizado, que é comercialmente utilizada a permeabilidade hidráulica para classifica-los (DACANAL; BEAL, 2010; DEY *et al.*, 2004; JUDD; HILLIS, 2001).

1.3.7. FONTE PROTEICA

Na bioreação, além de uma fonte carbônica, faz-se necessário a adição de uma fonte proteica, que disponibilize o nitrogênio para que o microrganismo, fixador de nitrogênio, possa completar seu ciclo energético e assim produzir o biossurfactante desejado (NITSCHKE; PASTORE, 2006; PIGGOT; HILBERT, 2004). Muitos trabalhos utilizam duas fontes nitrogenadas comerciais de baixo custo:

- Extrato de levedura: Composto obtido do processo residual da produção de cerveja com alto valor proteico e com presença de carboidratos (IKONONOU *et al.*, 2001);
- Peptona bacteriológica: Composto obtido a partir da digestão enzimática da carne, com alto valor proteico, ausente de carbonos fermentescíveis e com a presença de triptofano, utilizado na biossíntese de proteínas (CARVALHO *et al.*, 2008).

Diante disto, faz-se necessário um microrganismo que se adapte a este meio e produza o biossurfactante. Assim *Bacillus subtilis* se encaixa perfeitamente nesse

perfil, visto que é de fácil obtenção, baixo custo e de fácil adaptação ao meio a qual é submetido (FILHO; FERRO; PINHO, 2010; MARIM, 2014).

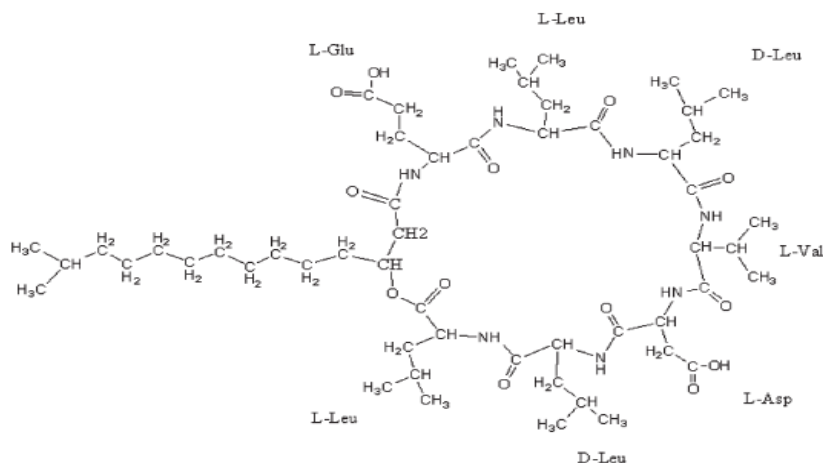
Pelo *B. Subtilis* ser um fixador de nitrogênio, amplamente utilizado na agricultura, que possui a forma de bastonete, capaz de produzir enzimas, biossurfactantes e outros compostos em menor escala. Este utiliza o açúcar redutor e o nitrogênio disponível, alinhados a um ajuste de pH, temperatura e aeração, para formar o biossurfactante em maior escala, e outros compostos em menor escala, fazendo assim necessário uma purificação do meio reacional para remover as células e os subprodutos oriundos de tal processo extra-celular (FERNÁNDEZ-NO *et al.*, 2013; JUNIOR, 2012; LIN *et al.*, 1994).

1.3.8. A SURFACTINA

O biossurfactante, por possuir uma estrutura anfifílica, pode ser purificado por exclusão, utilizando bolhas de ar, onde este fica aderido à superfície da bolha, ou utilizando um solvente como o etanol ou o metanol, onde a parte menos polar faz com que haja uma separação das fases, deixando o biossurfactante precipitado, sendo assim separado da fase aquosa por centrifugação e secagem (ALVES; SANTANA; SOARES, 2013; JUNIOR, 2012; MARIM, 2014).

Dentre os biossurfactantes produzidos pelo *Bacillus subtilis* um vem ganhando destaque pelas suas características específicas, como a ação bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral e anticoplasmático: a surfactina, que possui a estrutura demonstrada na figura 5 (BARROS *et al.*, 2007). Em suas aplicações na área alimentícia a formação e estabilização de emulsões é o principal motivo para um aumento significativo das pesquisas voltadas à ela e, por ser um produto de baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, o alvo das indústrias (JUNIOR, 2012).

Figura 5 - Estrutura da principal isoforma da surfactina.



Fonte: Adaptado de Barros e colaboradores (2007).

Uma das ferramentas que vem sendo amplamente utilizada na otimização de processos, tanto do ponto de vista acadêmico quanto industrial é o planejamento de experimentos. Tal ferramenta visa reduzir o número de experimentos afim de obter quais variáveis são importantes para o seu processo ou procedimento, e disponibilizar um resultado otimizado, removendo o que é desprezível e dando ênfase ao que é essencial. O planejamento de experimentos faz uma caracterização das variáveis ao longo das respostas obtidas experimentalmente, assim obtendo uma superfície de resposta, que descreve a resposta ao longo do deslocamento das variáveis codificadas (DEMING *et al.*, 1988). Dessa forma, torna-se interessante e importante o estudo para avaliar o otimizar o processo de obtenção e purificação de um biosurfactante utilizando *Bacillus subtilis* e o melaço, a fim de obter um produto com alto grau de pureza. Nesse sentido, os métodos quimiométricos tais como o planejamento e otimização de experimentos podem colaborar extensamente no processo de obtenção do biosurfactante (ALVES; SANTANA; SOARES, 2013; JUNIOR, 2012; MARIM, 2014).

Deste modo, este trabalho empregou planejamento experimental para otimizar as condições para a realização da hidrólise e clarificação do melaço, a fonte de carbono. *Bacillus subtilis* foi empregado como biocatalizador de processo e a técnica de borbulhamento, combinado a purificação etanólica, separou e purificou o biosurfactante. A produção do biosurfactante foi acompanhada através de espectroscopia NIR e PCA, enquanto que as etapas de borbulhamento e purificação etanólica foram avaliadas por teste estatístico adequado.

CAPÍTULO 2- HIDRÓLISE ÁCIDA

Os resultados deste capítulo foram submetidos para publicação no periódico Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems – Título do manuscrito: Considering an alternative validation for experimental design when ANOVA is not significant: A case study.

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

A fonte de carbono (substrato) empregada foi o melaço de cana-de-açúcar, cedido por empresa sucro-alcooleira em setembro de 2016.

O substrato foi preparado através de uma solução aquosa à 10% (m/v) de melaço em água destilada, conforme Marim (2014).

Na literatura encontrou-se uma variedade de metodologias usando três ácidos na hidrólise do melaço de cana-de-açúcar: HCl, H₂SO₄ e H₃PO₄ em diferentes concentrações ao longo de vários intervalos de tempo. Assim faz-se necessário avaliar a influência do ácido utilizado e do tempo na etapa de realização de hidrólise da fonte de carbono (RIAZ *et al.*, 2016; SIRIPONG *et al.*, 2016). Muitos experimentos seriam necessários se a otimização destes parâmetros fosse realizada de forma univariada. Nesse sentido, o planejamento experimental permite uma otimização multivariada dos parâmetros tipo de ácido a ser utilizado e tempo de hidrólise (FERREIRA, *et al.*, 2013; RIAZ *et al.*, 2016; SIRIPONG *et al.*, 2016), evidenciando as variáveis mais influentes no resultado (CUNICO *et al.*, 2008) e reduzindo o número de ensaios experimentais (DEMING *et al.*, 1988).

A etapa de hidrólise ácida foi otimizada através de um planejamento Doehlert. Este tipo de planejamento experimental foi o escolhido pela possibilidade de avaliar os fatores (variáveis) em diferentes níveis. Assim, de acordo com a Tabela 3, que ilustra os fatores nos níveis codificados, realizou-se 13 experimentos. O primeiro fator (concentração do ácido) variou em 5 níveis (mínimo 0,5 e máximo 10%), o segundo fator (tempo) com variação em 7 níveis (mínimo 15 minutos e máximo 60 minutos), enquanto o terceiro fator (tipo de ácido utilizado) variou em 3 níveis (HCl, H₃PO₄ e H₂SO₄).

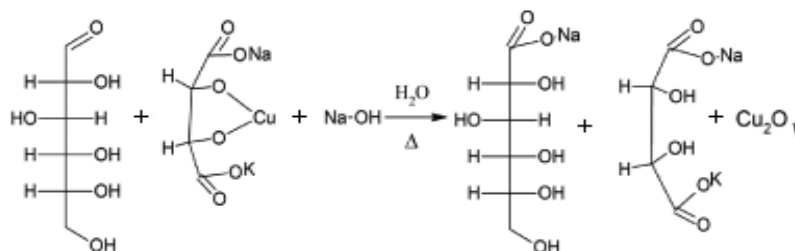
Tabela 3 - Planejamento experimental Doehlert.

Experimento	Concentração do ácido (%)	Tempo (min)	Ácido utilizado
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0,5	0,8660	0
4	0,5	0,2890	0,8170
5	-1	0	0
6	-0,5	-0,8660	0
7	-0,5	-0,2890	-0,8170
8	0,5	-0,8660	0
9	0,5	-0,2890	-0,8170
10	-0,5	0,8660	0
11	0	0,5770	-0,8170
12	-0,5	0,2890	0,8170
13	0	0,5770	0,8170

Fonte: adaptado de Ferreira e colaboradores (2004).

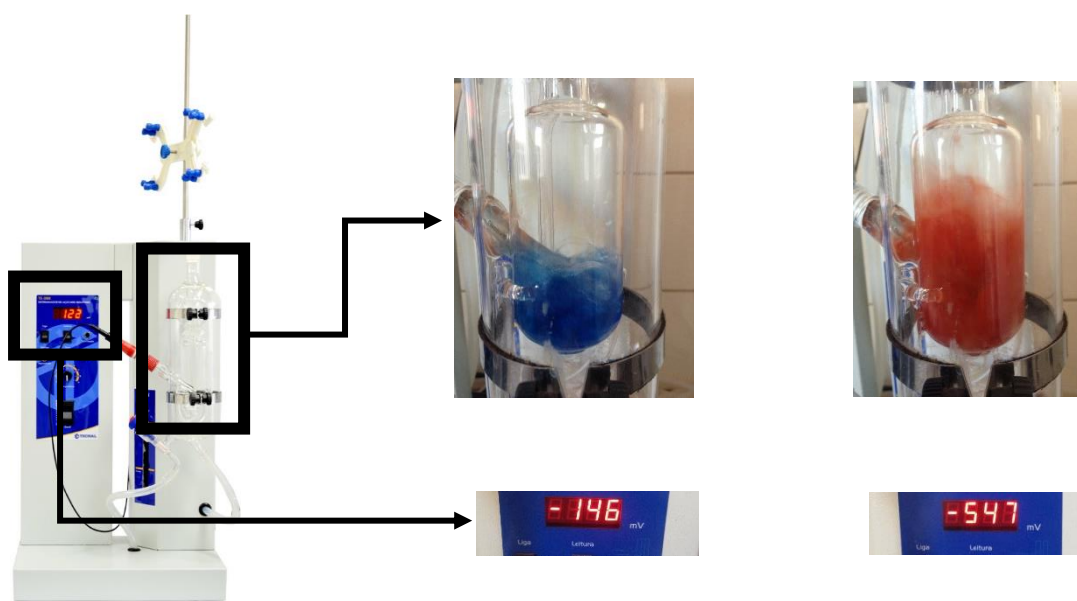
A variável dependente monitorada foi a concentração de açúcares redutores (AR), avaliado conforme metodologia de Lane-Eynon, que consiste em adicionar 10mL de solução de Fehling A (34,65 g de sulfato de cobre pentahidratado por litro de água), e 10 mL de solução de Fehling B (173 g de tartarato de sódio e potássio com 300 mL de NaOH 40% diluídas em 1 L de água), 3 gotas (3 mL) de azul de metileno e 20 mL de água destilada no redutímetro (modelo Redutec Marca Tecnal). Titulou-se essa mistura com a amostra previamente preparada na proporção de 1:9 amostra:água destilada. A reação observada acontece quando os monossacarídeos reduzem o íon Cu^{2+} para Cu_2O (figura 6) fazendo com que a solução, anteriormente azul, se torne avermelhada e precipite, conforme figura 7. Na determinação da concentração dos açúcares redutores foi utilizado o fator de correção (equação 1) com uma amostra contendo 0,5g de glicose anidra diluída em um balão de 100mL com água destilada. A concentração de açúcares redutores na amostra de interesse é obtida através da equação 2 (LUTZ, 2008).

Figura 6 - Reação de redução do íon cobre para óxido de cobre I.



Fonte: Adaptado de Santos, Gemmer, e Oliveira (2016).

Figura 7 – Ilustração do redutímetro e a visualização do ponto de viragem.



Fonte: Autoria própria

Nota: à esquerda o íon cobre com a voltagem baixa (coloração azulada) e à direita o óxido de cobre I com o aumento significativo da voltagem (coloração vermelha).

$$FC = \frac{\text{volume em mL gastos de glicose} \times \text{massa de glicose da amostra padrão (g)}}{\text{volume da diluição (mL)}} \quad (1)$$

$$[\text{glicose}] \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{FC \times \text{volume total da amostra diluída (mL)} \times \text{porcentagem} \times \text{diluição}}{\text{volume gasto na titulação (mL)} \times \text{volume da amostra (mL)}} \quad (2)$$

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para otimizar a etapa da hidrólise ácida através do planejamento Doehlert, os fatores tipo de ácidos (A) foram avaliados em 3 níveis (H_2SO_4 , H_3PO_4 e HCl), a

concentração de ácido (C) foi avaliada em 5 níveis e, o fator tempo de reação (T) em 7 níveis. O resultado de cada experimento foi avaliado através da concentração de açúcares redutores (y), descritas na Tabela 4. Os experimentos foram executados aleatoriamente, em temperatura ambiente, em triplicata, seguido de neutralização até pH 6,8 com solução de NaOH 5 mol L⁻¹.

Tabela 4 - Matriz de experimentos do planejamento experimental Doehlert para a hidrólise ácida. Valores entre parênteses corresponde à variável codificada.

Exp.	Concentração do ácido (C)	Tempo em minutos (T)	Ácido utilizado (A)	Concentração de açúcares redutores (AR) em gL ^{-1*}
1	(0) 5,25%	(0) 37,5	(0) Fosfórico	12,38
2	(1) 10,00%	(0) 37,5	(0) Fosfórico	12,35
3	(0,5) 7,62%	(0,866) 60,0	(0) Fosfórico	11,06
4	(0,5) 7,62%	(0,289) 45,0	(0,817) Sulfúrico	45,81
5	(-1) 0,5%	(0) 37,5	(0) Fosfórico	12,37
6	(-0,5) 2,88%	(-0,866) 15,0	(0) Fosfórico	11,15
7	(-0,5) 2,88%	(-0,289) 30,0	(-0,817) Clorídrico	15,13
8	(0,5) 7,62%	(-0,866) 15,0	(0) Fosfórico	11,29
9	(0,5) 7,62%	(-0,289) 30,0	(-0,817) Clorídrico	29,95
10	(-0,5) 2,88%	(0,866) 60,0	(0) Fosfórico	13,76
11	(0) 5,25%	(0,577) 52,5	(-0,817) Clorídrico	31,2
12	(-0,5) 2,88%	(0,289) 45,0	(0,817) Sulfúrico	31,93
13	(0) 5,25%	(-0,577) 22,5	(0,817) Sulfúrico	46,64

Fonte: Autoria própria.

Nota: *Média de triplicatas

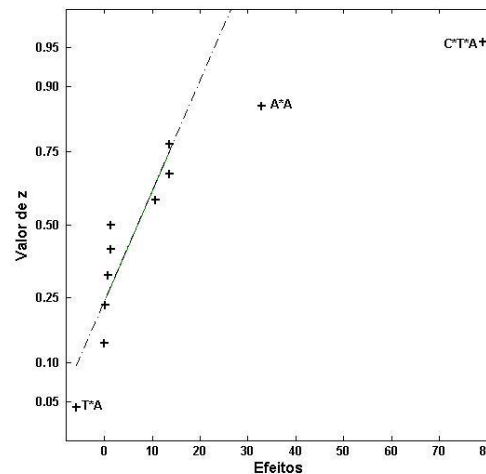
Com auxílio do software Matlab versão R2007b e do PLS-Toolbox 5.2 realizou-se uma Regressão Linear Múltipla (MLR) entre a matriz de dados codificada, considerando suas interações, e os valores de AR. Desta forma, os valores de coeficientes de regressão são apresentados na equação 3.

$$AR = 13,5400 + 0,6917C + 1,2247T + 13,5470A + 1,2991CT + 10,7277CA - 5,8220TA + 0,1600CC + 0,0233TT + 32,7986AA + 79,0652CTA \quad (3)$$

Existem diferentes maneiras de identificar quais efeitos (quais coeficientes de regressão) são ou não importantes (FILHO, 2017). Neste caso, utilizou-se o gráfico de probabilidade (NETO; SCARMINIOS; BRUNS, 2003) em que, basicamente, cada um dos efeitos é relacionado com áreas iguais de uma curva gaussiana. Cada média das áreas calculadas é então relacionada com um valor de z de uma Tabela de

probabilidades (FERREIRA, 2015). O resultado, ilustrado graficamente na figura 8, mostra que os efeitos pequenos estão aglomerados ao redor do zero. Estes efeitos são negligenciáveis e podem ser descartados. Já os efeitos mais importantes estão afastados do zero e devem ser considerados no modelo.

Figura 8- Gráfico dos efeitos *versus* valor de z para o planejamento Doehlert.



Fonte: Autoria própria.

Deste modo a equação do modelo (Equação 3) pode ser reescrita descartando os efeitos negligenciáveis que estão próximos do zero no eixo x e, portanto, considerando apenas os efeitos importantes (T*A, A*A e C*T*A) que estão afastados do zero. O novo modelo é descrito pela equação 4.

$$AR = -5,8220TA + 32,7986AA + 79,0652CTA \quad (4)$$

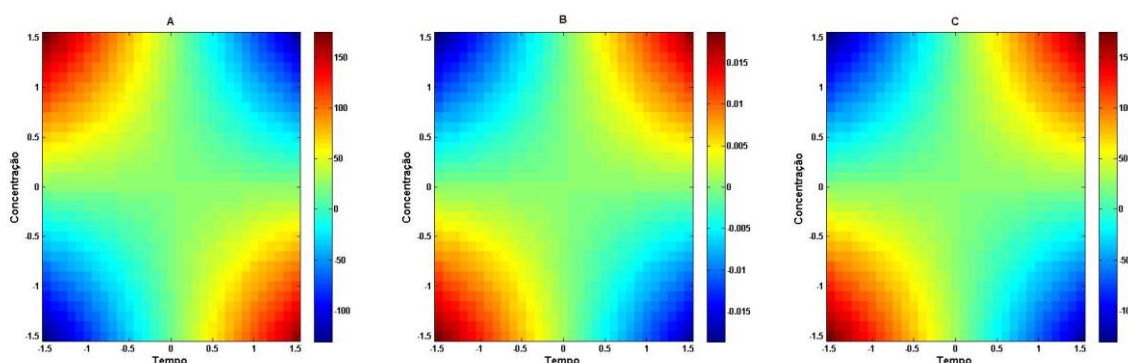
O último passo, após a obtenção do modelo que descreve o sistema em estudo, é uma validação, para verificar e confirmar os resultados alcançados (ENNACIRI *et al.*, 2014). O modelo obtido pode não ser exatamente aquele que descreve a região estudada do sistema e, neste caso, não pode ser usado para fazer estimativas de deslocamento e muito menos para tirar conclusões sobre a região ideal. Uma das maneiras mais utilizadas para avaliar a qualidade do ajuste do modelo é usar a análise de variância (ANOVA) (CHRISTENSEN, 2000; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Para o modelo descrito pela equação 4 os resultados da ANOVA demonstram falta de ajuste do modelo. Entretanto, o modelo leva a resultados satisfatórios e, então, propõe-se uma validação alternativa para destacar alguns parâmetros de mérito que viabilizam o uso do modelo.

O primeiro parâmetro de mérito considerado foi o erro médio quadrático da calibração (RMSEC), com um resultado de 9,75, é considerado como um dos parâmetros de exatidão em modelos de calibração multivariada (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Outro parâmetro que é considerado conjuntamente com o RMSEC na avaliação da exatidão é o coeficiente de correlação para o ajuste entre os resultados obtidos experimentalmente e os resultados obtidos através da previsão utilizando o modelo multivariado (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Neste caso, o coeficiente de correlação para o modelo da equação 4 foi de 0,8204. Resultados similares são reportados na literatura para o coeficiente de correlação quando os resultados experimentais são obtidos através de titulação de oxidação-redução (SANTOS *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2016; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007).

A partir do modelo de regressão, descrito pela equação 4, fixou-se o fator tipo de ácido (A) em cada um dos três níveis estudados e, obteve-se os gráficos de contorno apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Gráficos de contorno. (A) Efeito do HCl. (B) Efeito do H₃PO₄. (C) Efeito do H₂SO₄.



Fonte: Autoria própria.

Os gráficos de contorno mostram que com o ácido HCl maiores quantidades de açúcares redutores podem ser obtidas quando a concentração do ácido aumenta e o tempo de reação diminui, ou vice-versa, quando a concentração do ácido diminui e o tempo de reação aumenta. Com o ácido fosfórico observou-se pouca conversão a

açúcares redutores na reação de hidrólise. Para o H_2SO_4 a redução da concentração e do tempo de reação, ou o aumento da concentração e do tempo de reação, promovem uma maior quantidade de açúcares redutores na hidrólise.

De posse desses resultados, os ácidos clorídrico e sulfúrico foram considerados em uma avaliação experimental na hidrólise do melado de cana-de-açúcar, nas condições experimentais que favoreceriam a formação de açúcares redutores. Os resultados alcançados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Experimentos realizados a partir da análise dos gráficos de contorno utilizando os ácidos clorídrico e sulfúrico.

Exp.	T (min)	C (%)	Ácido	AR1 (gL-1)	AR2 (gL-1)	AR3 (gL-1)	Média AR (gL ⁻¹) ± Desvio padrão	AR esperado	RMSEP
1	60	0,5	HCl	50,94	49,44	50,18	50,19 ± 0,75	81,95	31,77
2	15	10	HCl	65,79	66,51	67,24	66,51 ± 0,72	73,71	7,22
3	15	0,5	H ₂ SO ₄	36,02	36,55	37,10	36,56 ± 0,54	81,95	45,40
4	60	10	H ₂ SO ₄	79,36	76,56	79,36	78,42 ± 1,62	73,71	4,90

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados descritos na Tabela 3, verifica-se que o erro médio quadrático da previsão (RMSEP) apresentou-se menor para o experimento realizado com o ácido sulfúrico a 10%, no tempo de 60 minutos. Considerando que a exatidão expressa o grau de concordância entre o valor medido e o valor tido como referência (ICH 1997), quanto menor o seu resultado maior a exatidão, ou seja, menor o erro. De fato, verifica-se que essa condição experimental foi a que resultou em uma concentração de açúcares redutores mais próxima do resultado esperado (que seria o resultado obtido através do modelo da equação 4).

Uma outra maneira de confirmar essa condição experimental foi investigada através do teste de linearidade proposto por Jarque e Bera (1987). A partir deste teste avaliou-se estatisticamente se a distribuição dos resíduos para as amostras de validação seguia um comportamento aleatório (BELTRAME *et al.*, 2016). O resultado mostrou que a hipótese nula pode ser aceita com 95% de confiança. Isso implica que os resíduos seguem uma distribuição normal (são aleatoriamente distribuídos), o que reforça que o modelo segue um comportamento linear.

Os resultados obtidos experimentalmente foram contrastados com os resultados teóricos (AR esperado) de acordo com um teste t-pareado, um teste de significância empregado para comparação de dois pares de resultados obtidos por metodologias diferentes (MILLER; MILLER, 1993). O primeiro passo na execução do teste consiste em calcular a média dos resultados obtidos por cada uma das metodologias (d_M) e o somatório da diferença ao quadrado entre as médias dos resultados obtidos entre ambas as metodologias, como na equação 5:

$$d_M = \overline{M_1} - \overline{M_2} \quad (5)$$

O desvio padrão das diferenças (s_d) é então estimado, para o número de amostras analisadas (n):

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum d_i^2 - n d_M^2}{n-1}} \quad (6)$$

Por fim, um valor de t é calculado através da equação 7. Quando o resultado para t calculado for menor que o valor de t tabelado, dentro da percentagem de confiança desejada, então não é possível detectar diferença entre as duas metodologias no nível de significância considerado.

$$t = \frac{\sqrt{n} d_M}{s_d} \quad (7)$$

A partir do teste t-pareado obteve-se um valor de t calculado de 3,434 contra um t tabelado de 4,303 para 95% de confiança. Este resultado mostra que não existe diferença significativa entre os resultados experimentais e os resultados esperados para a quantificação do AR. Dessa forma, a condição experimental utilizando ácido sulfúrico 10% e o tempo de reação de 60 minutos foi empregada na realização da hidrólise visando aumentar a concentração de AR disponível no substrato.

2.3. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

A hidrólise do substrato é de grande importância, pois o microrganismo utiliza como fonte de carbon o açúcar redutor para a produção em maior quantidade de biossurfactante. Dessa forma, o planejamento Doehlert contribuiu significativamente uma vez que permitiu avaliar os fatores em diferentes níveis e, por não contemplar

experimentos envolvendo todos os fatores com nível superior e/ou todos com nível inferior, permitiu a realização de um número menor de experimentos na obtenção das condições experimentais otimizadas para a hidrólise.

Apesar de o modelo obtido através do planejamento Doehlert ter apresentado falta de ajuste de acordo com a ANOVA, uma validação alternativa considerando os parâmetros de mérito exatidão, ajuste e linearidade mostrou viabilidade no modelo para encontrar as condições experimentais otimizadas na obtenção de uma maior concentração de açúcares redutores a partir da hidrólise ácida do melaço de cana-de-açúcar.

O teste t-pareado permitiu concluir que não houve diferença significativa, no nível de confiança de 95%, entre os resultados obtidos experimentalmente e aqueles esperados (estimados pelo modelo proposto, apesar da falta de ajuste). Nesse sentido, a condição experimental otimizada para obtenção de uma maior concentração de açúcares redutores, a partir da hidrólise ácida do melaço de cana-de-açúcar, foi empregar o ácido sulfúrico 10% ao longo de 60 minutos de reação.

CAPÍTULO 3- CLARIFICAÇÃO DO SUBSTRATO

Os resultados deste capítulo serão submetidos para publicação no periódico Separation and Purification Technology.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

O melaço hidrolisado com ácido sulfúrico 10% por 60 minutos (condição otimizada no capítulo anterior) foi submetido a dois procedimentos visando a clarificação conforme estabelece a ANVISA (CNNPA n° 12/78): o primeiro através de acetato de chumbo (II) (sub-acetato de chumbo ou acetato de chumbo básico, $Pb(CH_3COO)_2 \cdot Pb(OH)_2$), e o segundo usando a filtração por membrana (Módulo de Membrana-Pam). Em ambos os casos, empregou-se um planejamento fatorial 2^2 , conforme Tabela 6 para variáveis codificadas, em dois níveis. Assim, em cada procedimento de clarificação foram realizados 4 experimentos. Na clarificação a partir do sub-acetato de chumbo as variáveis foram quantidade do reagente (mínimo 0,5g e máximo 2,0g) e o tempo (mínimo 0,5 minutos e máximo 1,0 minuto). Empregando o sistema de ultrafiltração, as variáveis estudadas foram pressão (mínimo 1 Bar e máximo 3 Bar) e permeabilidade (mínimo 121 L/min e máximo 197 L/min).

Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^2 , sendo X_1 e X_2 as variáveis independentes.

EXPERIMENTO	X1	X2
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1

Fonte: Adaptado de Cunico e colaboradores (2008).

A variável dependente monitorada em cada experimento foi a cor, avaliada através da absorbância em 475 nm utilizando um equipamento de espectroscopia (OCEAN OPTICS, UV-RED TIB USB 650 UV).

3.2. RESULTADO E DISCUSSÃO

Nesta etapa realizou-se planejamentos fatoriais 2^2 para avaliar a clarificação do melaço (substrato) hidrolisado. Para tanto, utilizou-se o melaço que foi hidrolisado com ácido sulfúrico 10% por 60 minutos (condições otimizadas no capítulo anterior) e a clarificação foi testada a partir do sub-acetato de chumbo e a partir dos sistemas de ultrafiltração e microfiltração.

3.2.1. CLARIFICAÇÃO DO SUBSTRATO UTILIZANDO O ULTRAFILTRAÇÃO

A filtração tem por ação a retenção de partículas ou moléculas, reduzindo a quantidade de substâncias dispersas (DEY *et al.*, 2004). O sistema conta com uma bomba afim de pressurizar o sistema e uma membrana, cuja permeabilidade é variável. Neste caso, um planejamento fatorial do tipo 2^2 foi empregado, e os fatores avaliados foram a pressão (Bar) e a permeabilidade da membrana (L/min). A Tabela 7 apresenta os níveis avaliados para cada fator, bem como a resposta dos experimentos que, neste caso, foi a absorbância em 475nm.

Alguns trabalhos descreveram que a região espectral em torno de 475 nm corresponde a absorção das melanoidinas presente no melaço de cana-de-açúcar, um composto formado a partir da reação entre um açúcar e uma fonte proteica, que apresenta coloração escura, responsável por definir diversos sabores e cores em alimentos (JUNIOR; CRUZ, 2007; MILANI; FERREIRA; CRUZ, 2001).

Tabela 7 - Resultados do planejamento fatorial 2^2 na clarificação do substrato hidrolisado a partir do sistema de ultra e microfiltração. Valores entre parênteses correspondem as variáveis codificadas.

Exp.	Pressão (Bar)	Permeabilidade (L/min)	Absorbância 475 nm (ABS)
1	1 (-1)	121 (-1)	0,2636
2	3 (+1)	121 (-1)	0,1063
3	1 (-1)	197 (+1)	0,2074
4	3 (+1)	197 (+1)	0,0691

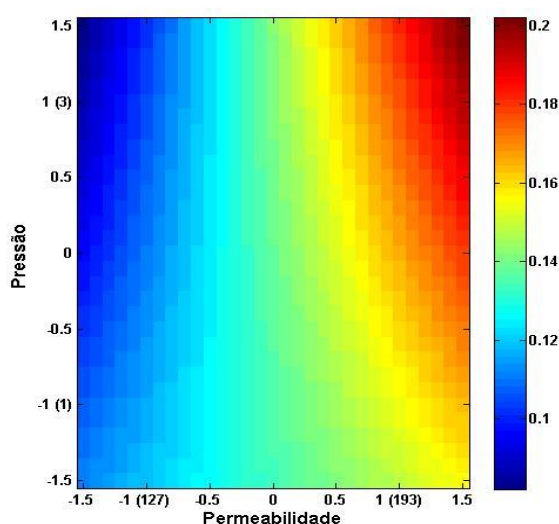
Fonte: Autoria própria.

Um modelo de regressão multivariada MLR foi desenvolvido a partir do software Matlab R2007b e PLS-Toolbox 5.2. A equação 8 apresenta os valores dos coeficientes de regressão obtidos para este modelo. Neste caso, a validação alternativa considerando os parâmetros de exatidão RMSEC, RMSEP, coeficiente de correlação para o ajuste foi considerada. O valor de RMSEC para o modelo descrito pela equação 8 foi de $3,74 \times 10^{-7}$ com um coeficiente de regressão de 0,9999.

$$ABS = 0,1380 + 0,0026P + 0,0274P_{perm} + 0,0082PP_{perm} \quad (8)$$

A partir da equação 8 observa-se que o processo de clarificação do melão hidrolisado a partir do sistema de ultra e microfiltração não é descrito por um modelo quadrático. Com essa equação foi possível obter o gráfico de contorno da Figura 10.

Figura 10 - Gráfico de contorno na otimização da clarificação do melão hidrolisado a partir do sistema de ultra e microfiltração.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados mostram que a absorvância diminui com o aumento da pressão e uma redução na permeabilidade do sistema. Com isso verifica-se que utilizando o módulo de ultrafiltração (o qual se refere a permeabilidade de 121 L/min) tem-se substrato hidrolisado mais clarificado, principalmente quando alinhado à máxima pressão que o sistema suporta, que é de 3 Bar. Além disso, não seria possível uma redução da permeabilidade pela indisponibilidade de membranas com menor diâmetro de poro. Portanto, estas condições experimentais empregando a ultrafiltração, em conjunto com os resultados alcançados com a clarificação empregando o sub-acetato de chumbo, serão investigadas para a continuidade do processo de produção do biosurfactante.

3.2.2. CLARIFICAÇÃO DO SUBSTRATO UTILIZANDO O SUB-ACETATO DE CHUMBO

O sub-acetato de chumbo tem por característica separar compostos dispersos do melão ao longo de um curto tempo reacional (CAROCODEL *et al.*, 2010). Desta forma, um planejamento fatorial do tipo 2^2 foi empregado visando otimizar a quantidade e o tempo de clarificação empregando este reagente. Os fatores avaliados foram quantidade de sub-acetato de chumbo (em gramas) e o tempo de mistura (em minutos), como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados do planejamento fatorial 2^2 na clarificação do substrato hidrolisado a partir do sub-acetato de chumbo. Valores entre parênteses correspondem as variáveis codificadas.

Exp.	Quantidade (g)	Tempo de reação (min)	Absorbância 475 nm (ABS)
1	0,5 (-1)	0,5 (-1)	0,1162
2	2 (+1)	0,5 (-1)	0,1049
3	0,5 (-1)	1 (+1)	0,1545
4	2 (+1)	1 (+1)	0,1764

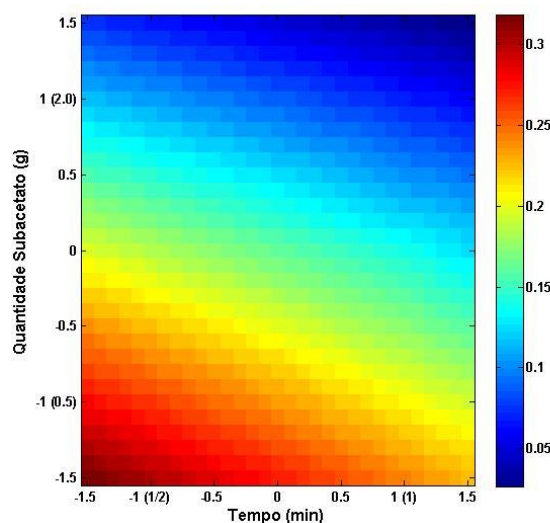
Fonte: Autoria própria.

Como resposta também se avaliou a cor através da absorbância em 475 nm (Tabela 6). Um modelo de regressão multivariada MLR foi desenvolvido a partir do software Matlab R2007b e PLS-Toolbox 5.2. A equação 9 apresenta os valores dos coeficientes de regressão obtidos para este modelo. O valor de RMSEC foi de $3,10 \times 10^{-7}$ com um coeficiente de regressão de 0,9999. Um teste t foi empregado na avaliação de possíveis erros sistemáticos presentes no modelo (ASTM E1655-05, 2005, VALDERRAMA *et al.* 2009). De acordo com o valor de t calculado 0,445 os erros sistemáticos presentes no modelo não são significativos com 95% de confiança, uma vez que esse valor é inferior ao valor de t tabelado 3,182.

$$ABS = 0,1616 - 0,0739C - 0,0234T + 0,0047CT \quad (9)$$

A partir da equação 11 observa-se que o processo de clarificação do melão hidrolisado com sub-acetato de chumbo não é descrito por um modelo quadrático. Com essa equação foi possível obter o gráfico de contorno da Figura 11.

Figura 11 – Gráfico de contorno na otimização da clarificação do melão hidrolisado a partir do sub-acetato de chumbo.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados mostram que a absorbância diminui com o aumento do tempo de reação de clarificação e da quantidade (em gramas) de sub-acetato de chumbo. Assim, uma menor absorbância indica uma maior clarificação do melão hidrolisado. Dessa forma, novos experimentos foram conduzidos, utilizando essas condições experimentais apontadas pelo planejamento fatorial, e seus resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados obtidos empregando-se as condições otimizadas através do planejamento 2^2 para a clarificação do melão hidrolisado a partir do sub-acetato de chumbo.

Exp	Quantidade (g)	Tempo (min)	ABS (1) 475 nm	ABS (2) 475 nm	ABS (3) 475 nm	Média ABS \pm Desvio padrão	ABS esperado	RMSEP
1	3	1,5	0,028	0,028	0,031	$0,029 \pm 0,002$	0,026	$3,0 \times 10^{-3}$
2	4	2	0,540	0,610	0,609	$0,586 \pm 0,040$	0,014	0,573

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar a Tabela 9 é possível notar que utilizando 3g de sub-acetato e um tempo de reação de 1,5 minutos obtém-se um decréscimo considerável na

absorbância em 475 nm. O °Brix foi monitorado antes e após a clarificação e manteve-se constante, indicando que os sólidos solúveis foram mantidos após o tratamento. A partir dos valores de exatidão (RMSEP e RMSEC) verifica-se, portanto, que a condição experimental otimizada para a clarificação do substrato hidrolisado ocorre empregando 3g de sub-acetato de chumbo e 1,5 minutos de reação.

3.3. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

O clareamento, ou clarificação do substrato hidrolisado faz com que substâncias indesejáveis sejam removidas do bioprocessamento. Conclui-se que ao utilizar a clarificação a partir de 3 g de sub-acetato de chumbo ao longo de 1,5 minutos de reação obtém-se uma clarificação mais eficiente do que utilizando o sistema de ultrafiltração a uma pressão de 3 bar (permeabilidade da membrana 121 L/min).

O uso do sub-acetato ainda necessita de uma atenção específica. Por melhor que seja o resultado alcançado, uma remoção total/parcial do chumbo residual se faz necessária antes do próximo passo do bioprocessamento.

CAPÍTULO 4- PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE

Os resultados deste capítulo serão submetidos para publicação no periódico Food and Bioprocess Technology.

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

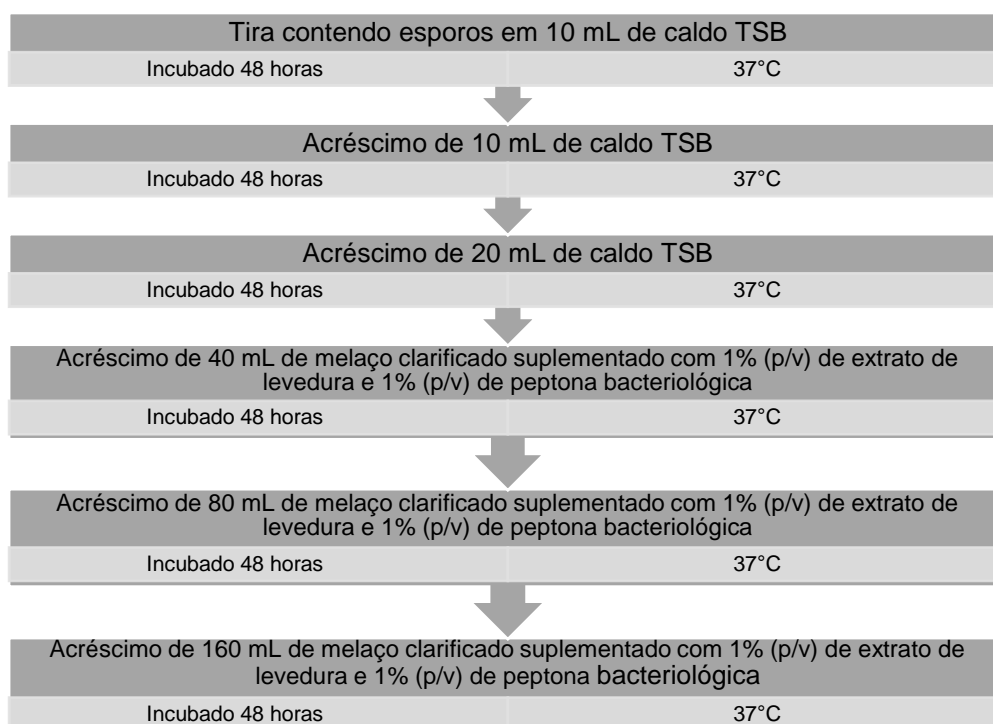
Todos os materiais utilizados neste capítulo foram esterilizados conforme a instruções de uso da Autoclave vertical (Marca: *Labstore*), antes e após o seu uso no bioprocesso.

4.1.1. PREPARO DO INÓCULO

A bactéria *Bacillus subtilis*, utilizada para obtenção do biossurfactante, foi doada em março de 2017 por uma empresa de biotecnologia, na forma de uma tira de papel/suporte onde o microrganismo encontra-se seco e esporulado.

A ativação do isolado se deu conforme o procedimento descrito na Figura 12, em duplicata.

Figura 12 - Esquema ilustrativo do procedimento de ativação e preparo do inóculo do microrganismo.



Fonte: Autoria própria.

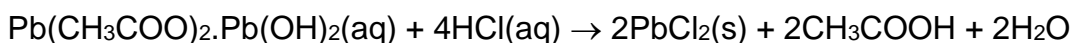
Nota: TSB - é a fonte nutricional utilizada para o cultivo e desenvolvimento de microrganismos, como *Bacillus subtilis*, composto por nitrogênio, carbono, cloreto de sódio e fosfato-dipotássio. TSB – ágar: para o plaqueamento e posterior incubação.

O meio de cultura sintético *Tryptone Soy Broth* (TSB) (Marca: *Difco*) foi preparado de acordo com a instrução do fabricante.

Ao fim do procedimento descrito na figura 12 foi realizada a técnica de diluição seriada, onde alíquotas de 1 ml de todos os tubos da série de diluição foram transferidas para placa de petri seguidas de adição do meio de cultura *Tryptone Soy Broth* adicionado ágar-ágar (TSB-ágar) para o plaqueamento e posterior incubação a 37°C por 48 horas. Após esse período foi realizada a contagem dos microrganismos nas placas (JAY, 2005).

4.1.2. REMOÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CHUMBO

O chumbo presente no sub-acetato de chumbo foi removido para atender a legislação vigente visto que sua ação é indesejada e prejudicial ao organismo humano (ANVISA, 1978). A remoção de tal componente consistiu na adição de uma solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ promovendo a precipitação do chumbo na forma de um sal conforme sugerido por Jeffery e colaboradores (1989), seguido de filtração para a separação do precipitado, de acordo com Lutz (2008). Tal reação pode ser observada na seguinte equação química:



A concentração de chumbo foi acompanhada através da espectroscopia de absorção atômica em chama (Marca: Analytik Jena AG, Modelo: novAA300) como sugerido por Lutz (2008), utilizando a lâmpada de cátodo ôco, antes e após a remoção do chumbo. Uma curva de calibração externa foi considerada na faixa de concentração de chumbo de 0 a 30 mgL⁻¹.

4.1.3. BIOPROCESSO

Os meios de cultura clarificado com subacetato de chumbo e ultrafiltração, conforme descrito no capítulo 3, foram adicionados de uma fonte nitrogenada, contendo 1% do volume reacional de extrato de levedura comercial (Marca: *Difco*) e 1% do volume reacional de peptona bacteriológica (Marca: *Difco*) solubilizadas em 10mL de água destilada. Seguidamente o inóculo, preparado conforme a figura 12, foi adicionado ao meio de cultura na concentração 10% (v/v).

A fermentação ocorreu em erlenmeyers vedados submetidos a agitação em 160 rpm e temperatura de 37°C em uma incubadora com agitador orbital (Marca Novatecnica, modelo NT 712).

Ao longo do processo fermentativo foram coletadas amostras assepticamente, as quais foram centrifugadas.

4.1.3.1 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DO CALDO FERMENTADO

4.1.3.1.1 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA (MASSA CELULAR SECA)

Tal procedimento foi realizado utilizando o precipitado obtido, proveniente da centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. O tubo da centrífuga foi previamente seco, resfriado e pesado. Após a centrifugação a massa foi lavada com água destilada e centrifugada, realizando tal procedimento duas vezes. Então o tubo foi colocado em estufa a 60°C por 24 horas, resfriado, mantido em dessecador e pesado para o cálculo da biomassa seca. A massa celular seca foi calculada pela diferença entre a massa do tubo com biomassa seca e a massa do tubo vazio (JUNIOR, 2012).

4.1.3.1.2 DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO

A determinação de nitrogênio foi realizada conforme a metodologia proposta por Bradford (1976), com leituras de absorvância realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (OCEAN OPTICS, UV-RED TIB USB 650 UV) à 595 nm. Conforme estabelecido pela metodologia foram preparadas 5 soluções de albumina de concentrações conhecidas, após a obtenção das leituras de absorvância para cada solução obteve-se, a partir das equações 10 e 11, os parâmetros X_n (fator que correlaciona a concentração de albumina com sua absorvância) e FCC (fator de correção ao longo das correlações de X_n). Então as concentrações de nitrogênio das amostras foram determinadas através da equação 12.

$$Xn = \frac{\text{concentração de albumina } (\frac{g}{mL})}{\text{absorbância obtida em 595 nm}} \quad (10)$$

$$FCC = \frac{\sum Xn}{n} \quad (11)$$

$$\left[\text{proteína em } \frac{g}{mL} \right] = \frac{\text{absorbância da amostra } \times \text{ FCC}}{\text{volume de amostra adicionada na reação com o comassie (mL)}} \quad (12)$$

4.1.3.1.3 ESPECTROSCOPIA NIR

Um espectro NIR foi coletado nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, e 144 horas de bioprocessamento empregando um equipamento MicroNIR JDSU. Estes espectros foram avaliados através da PCA, empregando o software Matlab R2007b e as ferramentas do PLS-Toolbox 5.2.

Primeiramente, os espectros são organizados no formato de uma matriz **X**. Para tanto, cada linha da matriz **X** contém um espectro enquanto cada coluna da matriz **X** apresenta as informações das absorvâncias nos diferentes comprimentos de onda. O princípio da PCA (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987) consiste em decompor a matriz **X** em um produto de duas outras matrizes, uma matriz denominada de *scores* (**T**) e outra chamada de *loadings* (**P^T**) e isso acontece quando novos eixos, denominados componentes principais (PCs), são calculados. A matriz de *scores* carrega informações acerca das amostras, ou seja, das linhas da matriz **X**, enquanto que os *loadings* fornecem informações sobre as variáveis, ou colunas de **X**. Os resultados da decomposição da matriz **X** em *scores* e *loadings* podem ser interpretados graficamente (VALDERRAMA *et al.*, 2016).

4.1.3.1.4 DETERMINAÇÃO DE AR

A determinação de açúcares redutores seguiu a metodologia descrita no item 2.1.

4.1.3.1.5 DETERMINAÇÃO DE PRODUTO FORMADO (BIOSURFACTANTE SECO)

A técnica de borbulhamento ou flotação do caldo fermentativo foi utilizada para recuperar e purificar o biossurfactante. Para tanto foi utilizado um módulo de aeração composto por uma bomba com uma vazão de 5 Lmin^{-1} de ar estéril, acoplado a um primeiro recipiente contendo uma pedra porosa na entrada de ar que possibilitou a formação das bolhas. Tais bolhas foram coletadas em um segundo recipiente, contendo filtros de ar nas entradas e saídas do sistema (visando impossibilitar a entrada de microrganismos e protegendo a amostra e o vaso reacional), sendo liquefeitas em função de um sistema de pressurização. Esse líquido contendo o biossurfactante foi purificado ajustando-se o pH para 2,0 com HCl 6 mol L^{-1} , seguido da adição de 2 volumes de etanol a cada volume de amostra. Posteriormente o sistema foi homogeneizado, fechado e mantido em repouso a 0°C por 24 horas, para que ocorresse a precipitação do biossurfactante. Após este período, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com etanol refrigerado em temperatura 0°C . Tal procedimento foi realizado em duplicata e em seguida o precipitado foi seco no tubo em estufa à 37°C até atingir massa constante e posteriormente, mantido em dessecador. A massa foi obtida pela diferença entre a massa do tubo contendo o produto com o tubo sem o produto (ALVES; SANTANA; SOARES, 2013; SOBRINHO, 2007).

4.1.3.2 CÁLCULO DOS FATORES DE CONVERSÃO E PRODUTIVIDADE

Diante da alteração das variáveis ao longo do bioprocessamento, substrato, produto e biomassa, avaliou-se o quanto de substrato foi convertido em produto e o quanto de substrato foi convertido em célula, bem como foi possível obter o rendimento e a produtividade da fermentação através das descrições abaixo.

4.1.3.2.1 - FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM PRODUTO (G/G)

O fator de conversão de substrato em produto é definido através da relação apresentada na Equação 13.

$$\gamma_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (13)$$

$\gamma_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto (g/g)

ΔP : variação da concentração de produto formado (gL^{-1});

ΔS : variação da concentração de substrato (gL^{-1});

4.1.3.2.2 - FATOR DE CONVERSÃO DE SUBSTRATO EM CÉLULAS (G/G)

O fator de conversão de substrato em células é definido através da relação apresentada na Equação 14.

$$\gamma_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (14)$$

$\gamma_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células (g/g)

ΔS : variação da concentração de substrato (gL^{-1});

ΔX : variação da concentração de células (gL^{-1});

Deste modo obteve-se um fator de conversão de gramas de células por grama de produto formado.

4.1.3.2.3 PRODUTIVIDADE

A produtividade volumétrica é obtida pela relação entre a concentração obtida (em gL^{-1}) pelo tempo de processo. A produtividade mássica é obtida pela relação entre a massa obtida (g) e o tempo de processo, conforme descrito na equação 15 e 16.

$$\textit{Produtividade volumétrica} = \frac{\textit{concentração de bio surfactante}}{\textit{tempo decorrido}} \quad (15)$$

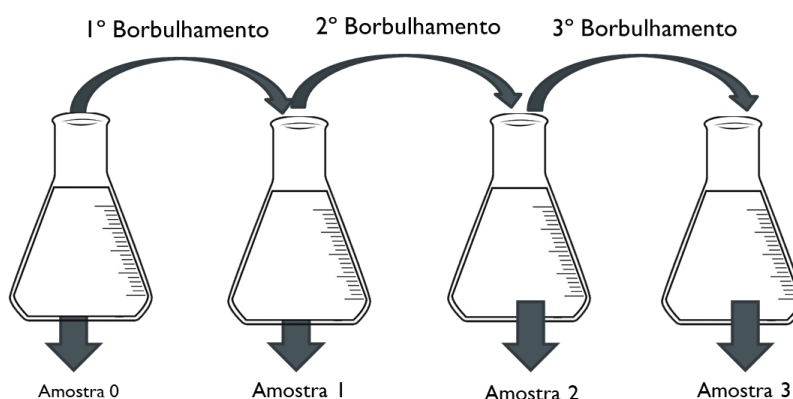
$$\textit{Produtividade mássica} = \frac{\textit{massa de bio surfactante}}{\textit{tempo decorrido}} \quad (16)$$

4.1.4. BORBULHAMENTO

Com o objetivo de avaliar a eficiência de recuperação de biossurfactante pela técnica de borbulhamento, a concentração de produto recuperado foi determinada para os processos: sem borbulhamento, um borbulhamento, dois borbulhamentos e tres borbulhamentos; ao fim da fermentação (ALVES; SANTANA; SOARES, 2013).

Para tal metodologia foi utilizado um sistema de aeração com vazão fixa que ocasionou a formação das bolhas que foram coletadas e liquefeitas em um recipiente fechado e estéril como apresentado na figura 13.

Figura 13 - Esquema ilustrativo da coleta de amostras para a análise dos borbulhamentos aplicados.



Fonte: Autoria própria

Ao final de cada etapa foram realizadas análises de biomassa, produto e açúcares redutores, seguindo as metodologias já apresentadas, e os dados obtidos foram comparados estatisticamente utilizando o teste de Tukey. Com isso foi possível determinar o melhor processo a ser utilizado para aumentar a concentração de biossurfactante.

4.2. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.2.1. PREPARO DO INÓCULO

O inóculo é formado a partir da adaptação do microrganismo ao meio a qual é submetido. Desta forma caso haja adaptação completa do microrganismo ao meio a

partir do quinto dia tem-se uma contagem elevada de microrganismos (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008). O preparo do inóculo consistiu em duas etapas, para o caso do *Bacillus subtilis*:

- Primeira etapa: preparo e readaptação do microrganismo, visto que este, após ser submetido a condições adversas, possui a capacidade de formar um esporo afim de se proteger e evitar a lise celular;
- Segunda etapa: adaptação do microrganismo ao melaço hidrolisado, clarificado com subacetato de chumbo. Nesta etapa ainda não foi empregado o HCl para retirada de chumbo do sistema (SELLA; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2014).

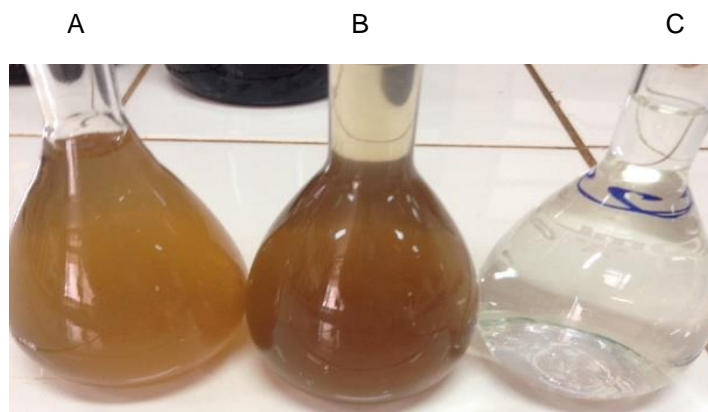
A adaptação do inóculo foi realizada utilizando TSB como meio para adaptação e crescimento do microrganismo na primeira etapa. O resultado positivo para a adaptação foi verificado pela turvação do meio, indicando crescimento celular, que anteriormente era límpido.

Após essa etapa foi adicionado o inóculo ao melaço hidrolisado, clarificado e esterilizado com pH ajustado para 6,8 com HCl 1 mol L⁻¹.

4.2.2. REMOÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CHUMBO

Para contornar a interferência do chumbo no processo, um experimento foi conduzido a partir do melaço hidrolisado e clarificado com subacetato de chumbo nas condições otimizadas de acordo com os planejamentos executados. A esse substrato clarificado, em temperatura ambiente, foram adicionados 5% de HCl 0,1 mol L⁻¹. O chumbo foi precipitado na forma de cloreto de chumbo e removido por filtração. A imagem da Figura 14 apresenta esses resultados. Foi observado uma duplicação do resultado para AR após a hidrólise e uma redução deste pela metade após a clarificação com o subacetato de chumbo seguido pela sua remoção por filtração.

Figura 14 - Resultados observados.



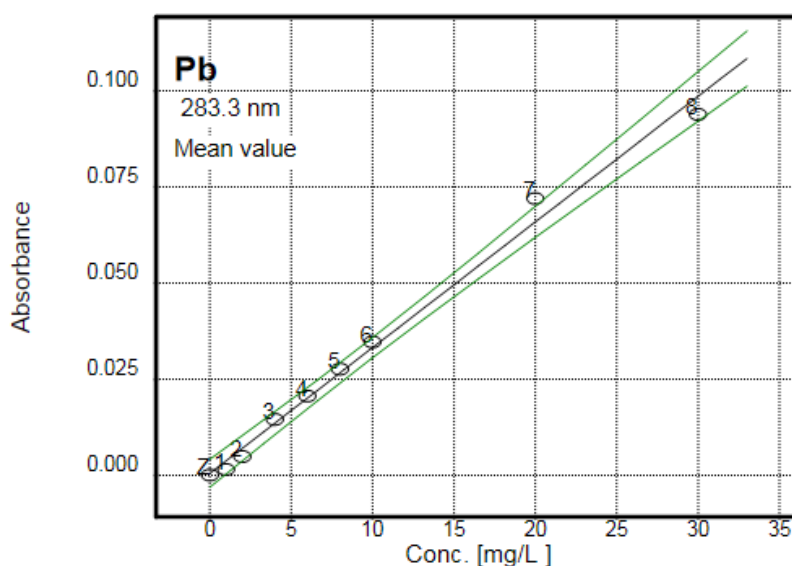
Fonte: Autoria própria.

Nota: Antes da hidrólise (A), após a hidrólise com ácido sulfúrico (B), após clarificação com subacetato de chumbo seguido pela sua remoção por filtração (C).

Para avaliar a concentração do chumbo presente na amostra, antes e após a remoção de tal constituinte, a espectroscopia de absorção atômica em chama foi considerada. A curva de calibração apresentada na figura 15, apresenta a equação de reta com coeficiente de correlação de 0,9885 descrita pela equação 17:

$$\text{Absorbância} = 0,000502 + 0,003270 * \text{concentração} \quad (17)$$

Figura 15 - Curva de calibração para quantificação do chumbo por absorção atômica em chama.



Fonte: Autoria própria.

As amostras com concentrações que extrapolaram a concentração máxima da curva de calibração foram diluídas em 1:10 (mL de amostra: mL de água). Tal diluição considerada no cálculo para a obtenção da concentração nessas amostras e os resultados obtidos estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10 - Resultados para quantificação do chumbo.

Amostra	Concentração de chumbo (mgL ⁻¹)	Desvio padrão
Melaço puro	0,266	± 0,102
Melaço após hidrólise e clarificação utilizando o subacetato de chumbo	1170,13	± 56,299
Melaço após hidrólise, clarificação e remoção do chumbo residual utilizando 0,5% (v:v) HCl P.A.	218,73	±12,110

Fonte: Autoria própria.

A utilização do HCl foi efetiva na remoção do chumbo, reduzindo em 81,31% a concentração do chumbo presente na amostra após a hidrólise e clarificação do mesmo. Deste modo, o melaço hidrolisado, clarificado com subacetato de chumbo e após etapa de remoção do chumbo até concentração de 218,73 mgL⁻¹ foi empregado no bioprocessamento, sem que este afete negativamente a ação microbiana, sendo assim possível produzir o biosurfactante através da bioreação.

4.2.3. BIOPROCESSO

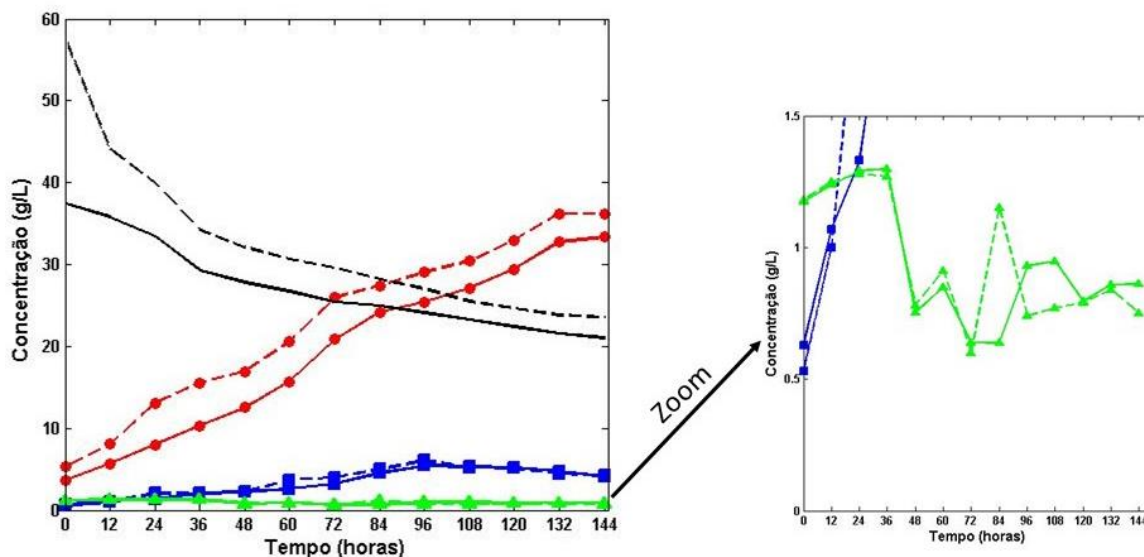
O bioprocessamento foi quantificado em relação à concentração de biomassa, de biosurfactante, de açúcares redutores, de nitrogênio e ao pH, conforme descritos no item 4.1. Estes resultados são apresentados na figura 16.

Pode-se observar que os dois bioprocessamentos, possuem comportamentos similares, com um aumento das concentrações de biomassa e do produto além de uma redução na concentração de açúcares redutores e uma manutenção da concentração de nitrogênio.

A redução dos açúcares redutores ocorre em função do metabolismo do microrganismo que utiliza esse substrato suplementado com nitrogênio para produzir o biosurfactante e se reproduzir (FERNÁNDEZ-NO *et al.*, 2013; NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Para a obtenção dos resultados da análise de nitrogênio, faz-se necessário o cálculo do fator de correção (FCC). Para tal cálculo foram realizadas as análises a partir de concentrações conhecidas, demonstrada na tabela 11, para assim obtermos o valor de 0,044826 de FCC, de acordo com o item 4.1.

Figura 16 - Resultados analíticos do Bioprocesso.



Fonte: Autoria própria.

Nota: Linhas contínuas: substrato clarificado com subacetato de chumbo; Linhas tracejadas: substrato clarificado com ultrafiltração; -●- Açúcares redutores; -■- Biosurfactante; -■- biomassa; -▲- Nitrogênio.

Tabela 11 - Pontos para a obtenção do FCC para cálculo de concentração de nitrogênio.

	Ponto 1 (10 μ L de albumina)	Ponto 2 (20 μ L de albumina)	Ponto 3 (30 μ L de albumina)	Ponto 4 (40 μ L de albumina)	Ponto 5 (50 μ L de albumina)
Média das absorvâncias	0,2485	0,473	0,6725	0,877	0,973

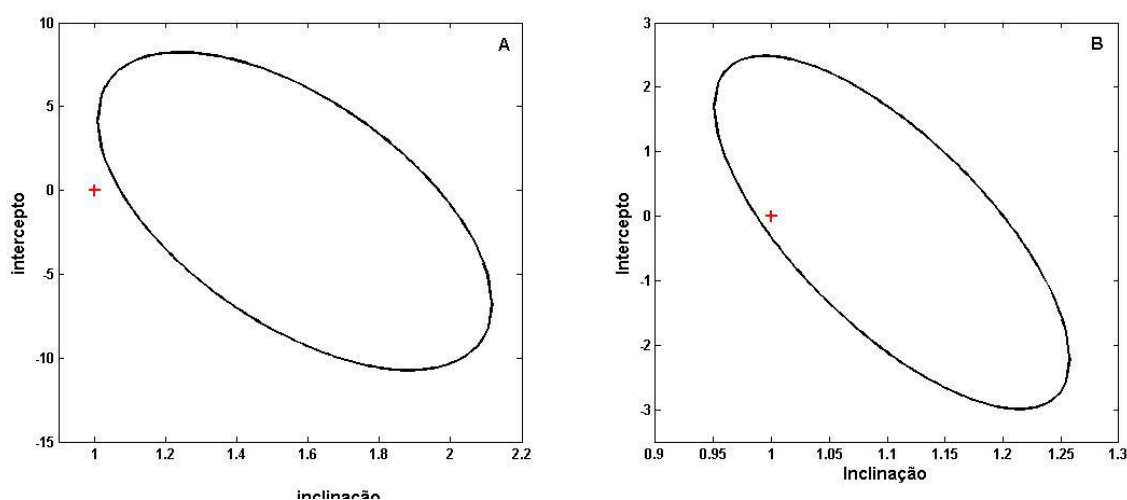
Fonte: Autoria própria.

As análises de pH foram realizadas utilizando o pHmetro (Marca: Tecnopon, Modelo: 210), onde os resultados expressos para ambas as análises se iniciaram em 6,8 e finalizaram com um pH de 4,6, indicando assim a produção de compostos que possuem características ácidas, como proteínas e ácidos carboxílicos (MARIM, 2014).

Os resultados para biomassa, produto, proteína, açúcar e pH foram considerados no tempo zero e após 144 horas de bioprocessamento a fim de verificar diferenças significativas entre os procedimentos de clarificação através do sistema de

ultrafiltração e empregando o subacetato de chumbo. Para tanto, empregou-se a região da elipse de confiança (ALMEIDA *et al.*, 2018). O método consiste em fazer a regressão linear entre os resultados obtidos por ambos os métodos de clarificação no tempo zero e, após 144 horas de bioprocessamento. A comparação é realizada através da inclinação e do intercepto, ajustados a um nível de confiança de 99%, em uma região elipsoidal. Se a região da elipse de confiança contiver o ponto ideal 1 e 0 para a inclinação e o intercepto, respectivamente, não existem diferenças significativas para os procedimentos de clarificação no tempo considerado, com 99% de confiança. O resultado pode ser visualizado através da figura 17.

Figura 17 - Elipse de confiança.



Fonte: Autoria própria.

Nota: (A) zero hora de bioprocessamento; (B) após 144 horas de bioprocessamento.

Através da Figura 17 verifica-se que os resultados para biomassa, produto, proteína, açúcar e pH para o bioprocessamento a partir do melado hidrolisado e clarificado com subacetato de chumbo e através do sistema de ultrafiltração são estatisticamente diferentes, no nível de 99% de confiança, no tempo zero de bioprocessamento. Entretanto, os resultados não apresentam diferença estatisticamente significativa após 144 horas de bioprocessamento. Estes resultados sugerem que o biosurfactante será produzido de maneira similar ao final do bioprocessamento, independentemente do procedimento utilizado na etapa de clarificação do melado hidrolisado.

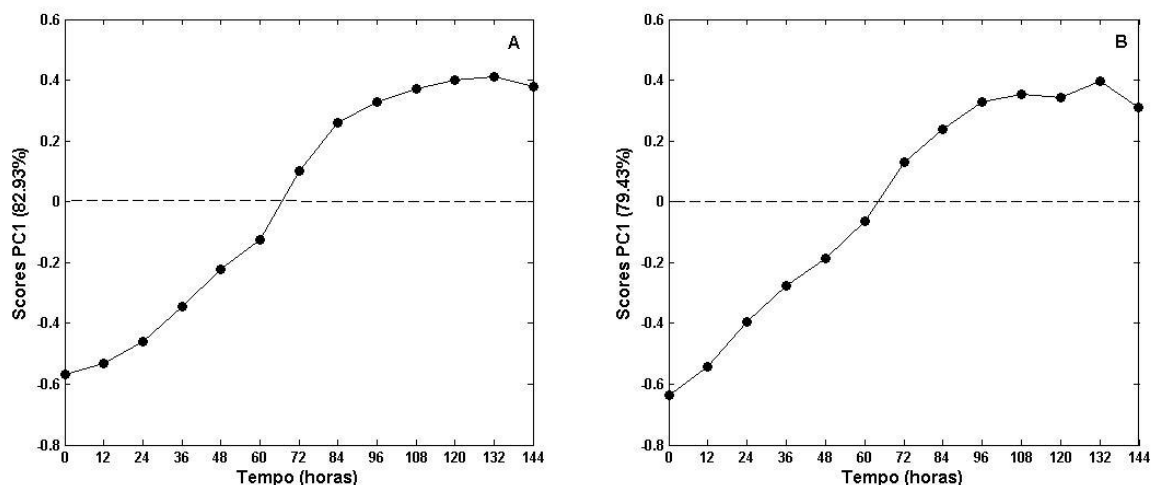
Objetivando explorar um pouco mais o bioprocessamento, os espectros NIR (coletados ao longo do tempo 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, e 144

horas de bioprocesso) e os resultados obtidos em laboratório para biomassa, produto, proteína e açúcar, (nos mesmos intervalos de tempo) foram considerados através de uma fusão de dados (BORRÀS *et al.*, 2015), onde a PCA foi aplicada. Para tanto, foi construída uma hipermatriz de dados (13 amostras e 129 variáveis) dos dois blocos fundidos (NIR – 13 x 125 + Laboratório – 13 x 4), respectivamente), usando a estratégia de fusão de dados de baixo nível, uma das abordagens mais comumente aplicadas (BORRÀS *et al.*, 2016).

A fusão de nível baixo consiste em combinar diretamente os sinais originais depois de alguns passos de pré-processamento (BORRÀS *et al.*, 2015). Desta forma, cada bloco de dados foi previamente pré-processado antes de sua junção na hipermatriz. Os resultados do laboratório foram normalizados enquanto os espectros NIR foram suavizados através do algoritmo *savgol* (SAVITZKY; GOLAY, 1964) e tiveram a linha de base corrigida através do algoritmo de correção do espalhamento multiplicativo (ISAKSSON; NAES, 1988). Na sequência os espectros foram ainda normalizados e, somente então, a fusão de dados foi implementada e a PCA foi aplicada sem pré-processamento.

A partir desta estratégia de fusão de dados e PCA é possível avaliar qual bloco tem maior influência no bioprocesso. Tanto para o bioprocesso a partir do melão hidrolisado e clarificado com subacetato de chumbo quanto por ultrafiltração, a primeira componente principal (PC1) capturou a variância dos dados responsável pela descrição do bioprocesso no gráfico dos *scores* na figura 18. Para ambos os casos se verifica que o bioprocesso evolui, ou seja, ocorre a formação de biosurfactante até o tempo de 108 horas de reação. A partir de então ocorre uma estabilização no bioprocesso.

Figura 18 – Scores do PCA.

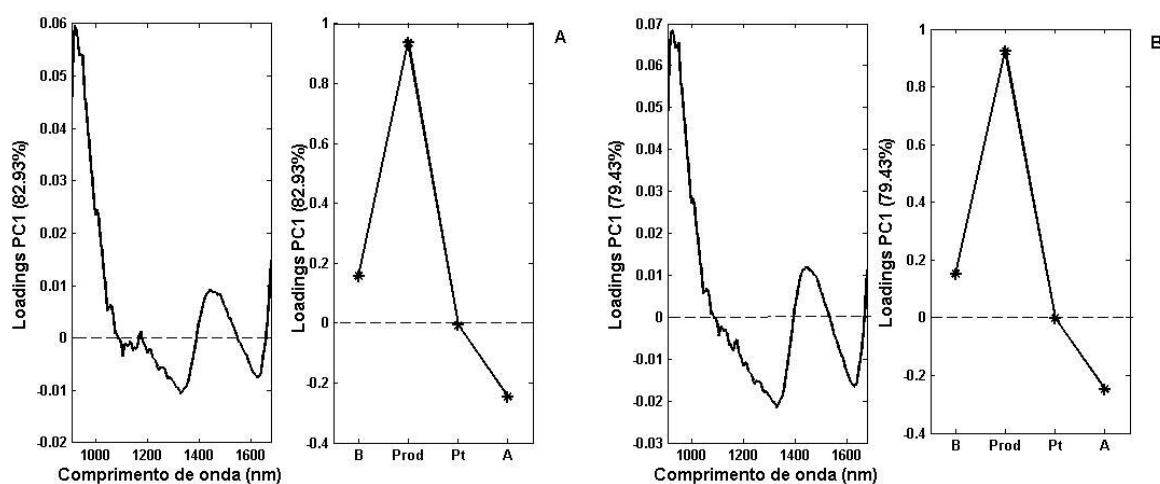


Fonte: Autoria própria.

Nota: (A) a partir de clarificação do melão hidrolisado com subacetato de chumbo. (B) a partir da clarificação do melão hidrolisado por ultrafiltração.

Os *loadings* da PCA na primeira componente principal (figura 19), fornecem as informações a respeito de quais variáveis, em cada bloco, são importantes para o padrão apresentado nos *scores*.

Figura 19 - Loadings do PCA.



Fonte: Autoria própria.

Nota: (A) a partir de clarificação do melão hidrolisado com subacetato de chumbo. (b) a partir da clarificação do melão hidrolisado por ultrafiltração. (B = Biomassa, Prod = Produto, Pt = Proteína, A = Açúcar redutor).

Os loadings revelam que até o tempo de 60 horas (parte negativa dos *scores*) as variáveis que apresentam maior influência no bioprocessamento são o açúcar redutor e as absorções na região do NIR correspondente ao segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃ e ArOH entre 1200 – 1400 nm e, ao primeiro overtone da ligação ArCH em torno de 1600 nm.

Após 72 horas de bioprocessamento as variáveis do quadrante positivo são as que mais influenciam no bioprocessamento, em ambos os casos, a biomassa e o produto. Tais variáveis estão correlacionadas com as regiões do NIR entre 900 -1100 nm (absorção do terceiro overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e ArCH) e 1400 -1500 nm (absorções do segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, CONHR, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e CONH₂) (METROHM NIRSYSTEMS, 2013).

A estrutura da surfactina (figura 5), um dos biosurfactantes produzidos pelo *B. subtilis*, é condizente com as absorções observadas na região do NIR após 72 horas de bioprocessamento, tal como a estrutura lipoproteica que constitui a estrutura da célula bacteriana.

4.2.3.1 CÁLCULO DOS FATORES DE CONVERSÃO E PRODUTIVIDADE

Através das equações 13, 14, 15 e 16 apresentadas nos itens 4.2.1.1.1, 4.2.1.1.2 e 4.2.1.1.3, os fatores de conversão de substrato em produto e de substrato em células, além da produtividade, em relação ao procedimento de clarificação empregado, são demonstrados na tabela 12.

Tabela 12 - Fatores teóricos obtidos pelo bioprocesso.

Tratamento	Subacetato de chumbo	Ultrafiltração
X/S	0,2086	0,1064
P/S	1,8062	0,9048
Produtividade volumétrica	0,2314 gL ⁻¹ h	0,2515 gL ⁻¹ h
Produtividade mássica	0,1157 gh ⁻¹	0,1257 gh ⁻¹

Fonte: Autoria própria.

Diante da análise dos dados nota-se que a ultrafiltração teve uma conversão de substrato em produto (P/S) e células (X/S) inferior quando comparado ao subacetato de chumbo, contudo suas produtividades foram superiores.

4.2.4. BORBULHAMENTO

Ao fim do bioprocesso alíquotas foram retiradas a fim de testar a efetividade do borbulhamento no aumento da produtividade do biosurfactante. Esta etapa consistiu em coletar as bolhas formadas e enviar a outro recipiente, em procedimentos com 1, 2 e 3 etapas borbulhamentos sobre a mesma amostra. Os resultados obtidos, média de triplicatas, estão dispostos na tabela 13.

Tabela 13 - Resultados do procedimento de borbulhamento.

Borbulhamentos	0		1		2		3	
Tratamentos	A	B	A	B	A	B	A	B
Biomassa	4,30	3,60	3,40	2,80	2,30	2,30	2,20	2,30
Produto	34,33	35,00	38,33	39,17	41,83	45,33	43,67	48,83
Açúcar	24,37	29,53	25,42	30,72	29,36	31,45	29,12	31,64

Fonte: Autoria própria.

Nota: A: clarificação do melaço hidrolisado a partir do subacetato de chumbo; B: clarificação do melaço hidrolisado a partir da ultrafiltração.

Analisando a tabela 14 podemos notar que com o aumento nos procedimentos de borbulhamentos tem-se um aumento na concentração de produto e uma manutenção da concentração de biomassa e açúcar. Um teste de Tukey (Tabela 13)

foi empregado para avaliar uma possível diferença estatística entre os resultados, onde verificou-se que há diferença estatística, no nível de 95%, quando se realiza 3 etapas de borbulhamento. Assim, pode-se concluir que o aumento da quantidade de borbulhamentos é diretamente proporcional ao aumento da concentração do produto.

Tabela 14- Teste de Tukey com alfa=0,05

Quantidade de borbulhamento	Tukey	p-valor	Conclusão
0 vs 1	2.5826	0.3808904	insignificante
0 vs 2	5.6362	0,0535448	insignificante
0 vs 3	7.3242	0.0223317	* p <0,05
1 vs 2	3.0536	0.2762434	insignificante
1 vs 3	4.7416	0.0908627	insignificante
2 vs 3	1.6880	0.6569995	insignificante

Fonte: Autoria própria.

4.3. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Ao longo do bioprocessamento observou-se a formação crescente do produto (biosurfactante) e uma redução na quantidade de açúcares redutores disponíveis. Uma avaliação estatística, através da elipse de confiança, mostrou diferença significativa no início do bioprocessamento realizado a partir do melão hidrolisado e clarificado com subacetato de chumbo e a partir da ultrafiltração. Entretanto, a diferença não é estatisticamente significativa, no nível de 99%, ao final da bioreação.

A PCA aplicada com a fusão dos dados de espectroscopia NIR e resultados laboratoriais para biomassa, produto, proteína e açúcar redutor, ao longo da bioreação, permitiu explorar de forma mais objetiva o bioprocessamento. Foi possível inferir sobre a formação de biosurfactante até o tempo de 108 horas de bioreação. A partir de então ocorre uma estabilização no bioprocessamento. Além disso, até o tempo de 60 horas de bioreação as variáveis que apresentam maior influência no bioprocessamento são o açúcar redutor e as absorções na região do NIR correspondente ao segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃ e ArOH entre 1200 – 1400 nm e, ao primeiro overtone da ligação ArCH em torno de 1600 nm. Após 72 horas de bioprocessamento as variáveis que mais influenciam a bioreação são a biomassa e o produto. Tais variáveis estão correlacionadas com as regiões do NIR entre 900 -1100 nm (absorção do

terceiro overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e ArCH) e 1400-1500 nm (absorções do segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, CONHR, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e CONH₂).

O borbulhamento realizado em 3 etapas aumentou a concentração de produto apresentou diferença estatística significativa, no nível de 95%, no teste de Tukey.

CAPÍTULO 5

5.1. CONCLUSÃO GERAL

A complexidade na produção de biosurfactantes faz com que o emprego de ferramentas quimiométricas de planejamento experimental multivariado sejam de grande importância para acelerar e otimizar as condições experimentais.

O planejamento Doehlert auxiliou na otimização do tipo do ácido e suas melhores condições experimentais para a hidrólise do melaço de cana-de-açúcar. Os resultados apontaram que o ácido sulfúrico 10% com um tempo de reação de 60 minutos proporciona um aumento na concentração de açúcares redutores.

A etapa de clarificação do melaço hidrolisado foi otimizada através de planejamento fatorial 2². Os clareamentos utilizando subacetato de chumbo e ultrafiltração foram considerados na etapa de produção do biosurfactante. Entretanto, com a utilização do subacetato de chumbo foi necessário incluir uma etapa para remoção do chumbo antes do início da bioreação, para assim obter uma melhora significativa do clareamento.

Ao longo do bioprocessamento observou-se a formação crescente do produto (biosurfactante) e uma redução na quantidade de açúcares redutores disponíveis. Uma avaliação estatística, através da elipse de confiança, mostrou diferença significativa no início do bioprocessamento realizado a partir do melaço hidrolisado e clarificado com subacetato de chumbo e a partir da ultrafiltração. Entretanto, a diferença não é estatisticamente significativa, no nível de 99%, ao final da bioreação. Contudo, do ponto de vista industrial e diante da grande procura por equipamentos que possam facilitar o processo, a ultrafiltração é de maior valia, onde ao longo do tempo faz-se necessário apenas a remoção da borra presente no filtro para assim tornar o processo em uma escala contínua.

A PCA aplicada com a fusão dos dados de espectroscopia NIR e resultados laboratoriais para biomassa, produto, proteína e açúcar redutor, ao longo da bioreação, permitiu explorar de forma mais objetiva o bioprocessamento. Foi possível inferir sobre a formação de biosurfactante até o tempo de 108 horas de bioreação. A partir de então ocorre uma estabilização no bioprocessamento. Além disso, até o tempo de 60 horas de bioreação as variáveis que apresentam maior influência no bioprocessamento são o açúcar redutor e as absorções na região do NIR correspondente ao segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃ e ArOH entre 1200 – 1400 nm e, ao primeiro overtone da ligação ArCH em torno de 1600 nm. Após 72 horas de bioprocessamento as

variáveis que mais influenciam a bioreação são a biomassa e o produto. Tais variáveis estão correlacionadas com as regiões do NIR entre 900 -1100 nm (absorção do terceiro overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e ArCH) e 1400 -1500 nm (absorções do segundo overtone das ligações CH, CH₂, CH₃, CONHR, ArOH, ROH, H₂O, RNH₂ e CONH₂).

O borbulhamento realizado em 3 etapas aumentou a concentração de produto e apresentou diferença estatística significativa, no nível de 95%, no teste de Tukey. Esse fator significativo implicaria em um processo com maior rendimento e assim uma redução do tempo de processo. Contudo a aquisição de equipamentos para a implantação pode ser um fator limitante, porém de extrema significancia para o processo.

5.2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M.; AMRANE, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desaliation** v. 223, n. November 2016, p. 143–151 , 2008.

ALVES, A. P. C.; SANTANA, C. C.; SOARES, C. M. F. Concentração em coluna de bolhas e espuma de surfactina obtida a partir de *Bacillus* sp ITP - 001 isolado de solo contaminado por petróleo. **Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em engenharia de processos da Universidade Tiradentes** p. 71 , 2013.

ANVISA. *Resolução CNNPA nº 12/78 .24/07/78*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78.pdf>. , 1978

ARAUJO, L.V. de; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: Anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Quimica Nova** v. 36, n. 6 , 2013.

ASTM E1655-05. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. **ASTM International** v. 5, n. Reapproved 2012, p. 29 , 2005. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Standard+Practice+s+for+Infrared+Multivariate+Quantitative+Analysis#0>>.

BARROS, F. F. C. *et al.* SURFACTINA: PROPRIEDADES QUÍMICAS, TECNOLÓGICAS E FUNCIONAIS PARA APLICAÇÕES EM ALIMENTOS. **Quimica Nova** v. 30, n. 2, p. 409–414 , 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, Cedenir Pereira De; PASTORE, Gláucia Maria. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 28, n. 4, p. 979–985 , 2008.

BELTRAME, K. K. *et al.* Soil organic carbon determination using NIRS: Evaluation of dichromate oxidation and dry combustion analysis as reference methods in multivariate calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 27, n. 9, p. 1527–1532 , 2016.

BERTON, C.; GENOT, C.; ROPERS, M. H. Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science** v. 354, n. 2, p. 739–748 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.11.055>>.0021-9797.

BINKS, B. P. Particles as surfactants - Similarities and differences. **Current Opinion in Colloid and Interface Science** v. 7, n. 1–2, p. 21–41 , 2002.1359-0294.

BORRÀS, E. *et al.* *Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment - A review*. **Analytica Chimica Acta**. [S.l: s.n.]. , 2015

BORRÀS, E. *et al.* Prediction of olive oil sensory descriptors using instrumental data fusion and partial least squares (PLS) regression. **Talanta** v. 155, p. 116–123 , 2016.0039-9140.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, n. 1–2, p. 248–254 , 1976.1600032697.

- BUENO, S. M. **Bactérias Produtoras De Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização E Comportamento Num Sistema Modelo**. [S.l: s.n.], 2008.
- CALVO, P. *et al.* Effects of microcapsule constitution on the quality of microencapsulated walnut oil. **European Journal of Lipid Science and Technology** v. 113, n. 10, p. 1273–1280 , 2011.1438-7697.
- CAROCODEL, L. *et al.* POLARISATION BY FILTRATION FOR CANE. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.** v. 27, p. 1–8 , 2010.
- CARVALHO, R. V. de *et al.* Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 28, n. 2, p. 380–386 , 2008.
- CASTEJON, L.V. Estudo da clarificação da lecitina de soja. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia** p. 140 , 2010.
- CHRISTENSEN, R. Analysis of Variance, Design, and Regression: Applied Statistical Methods. **CRC** p. 608 , 2000.9780412062919.
- COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M.; GIL, A. S. Lopes. Biossorção de Cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. **Revista CIATEC-UPF** v. 4, n. 1, p. 1–10 , 2012.
- CUNICO, M.W.M. *et al.* Factorial Desing: a Valuable Statistic Tool To Define Experimental Parameters Applied in Scientific Research. **Visão Acadêmica** v. 9, n. 1, p. 23–32 , 2008.
- DACANAL, M.; BEAL, L. L. Filtro anaeróbio associado à membrana de microfiltração tratando lixiviado de aterro sanitário. **Engenharia Sanitaria e Ambiental** v. 15, n. 1, p. 11–18 , 2010.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; OWEN, R. Fennema. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.
- DANVIRIYAKUL, S. *et al.* Physical Stability of Spray-Dried Milk Fat Emulsion as Affected by Emulsifiers and Processing Conditions. **Journal of Food Science** v. 67, n. 6, p. 2183–2189 , 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09524.x>>.
- DE ALMEIDA, M.M.C. *et al.* Textural, Color, Hygroscopic, Lipid Oxidation, and Sensory Properties of Cookies Containing Free and Microencapsulated Chia Oil. **Food and Bioprocess Technology** , 2018.
- DEMING, S.N. *et al.* Chemometrics : A textbook. **Data Handling in Science and Technology** v. 2, p. 477 , 1988.ISBN-10: 0444426604nISBN-13: 978-0444426604.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. 97/02677 Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Fuel and Energy Abstracts** v. 38, n. 4, p. 221 , 1997. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140670197845596>>.1092-2172 (Print)r1092-2172 (Linking).
- DEY, B. K. *et al.* Microfiltration of water-based paint effluents. **Advances in Environmental Research** v. 8, n. 3–4, p. 455–466 , 2004.
- DOS SANTOS, D. A. *et al.* Multiproduct, Multicomponent and Multivariate Calibration: a Case Study by Using Vis-NIR Spectroscopy. **Food Analytical Methods** , 2017.

ENNACIRI, K. *et al.* Application of fractional factorial and Doehlert designs for optimizing the preparation of activated carbons from Argan shells. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** v. 139, p. 48–57, 2014.0169-7439.

FAPPI, D. A. Micro e ultrafiltração como pós-tratamento para reuso de efluentes de abatedouro e frigorífico de suínos. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais. Medianeira, 2015.** 22. p. 126, 2015.

FELTRIN, V. P. *et al.* Produção de *Lactobacillus plantarum* em Melaço de. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 43, p. 1–6, 2000.

FERNÁNDEZ-NO, I. C. *et al.* Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. **Food Microbiology** v. 33, n. 2, p. 235–242, 2013.0740-0020.

FERREIRA, M. M. C. **QUIMIOMETRIA: CONCEITOS, MÉTODOS E APLICAÇÕES.** 2015. ed. Campinas: Unicamp, 2015. 496 p. .

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos.** Salvador: Vento Leste, 2015. 190 p. .978-85-8140-067-9.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry - Review. **Talanta** v. 63, n. 4, p. 1061–1067, 2004.0039-9140.

FERREIRA, S. M. *et al.* Produção de açúcares redutores por hidrólise ácida e enzimática de farinha de arroz. **Revista brasileira de produtos agroindustriais** v. 15, n. 62, p. 383–390, 2013.

FILHO, E. R. P. **Planejamento Fatorial em química: Maximizando a obtenção de resultados.** São Carlos: EdUFSCar, 2017. 88 p. Disponível em: <papers://ae99785b-2213-416d-aa7e-3a12880cc9b9/Paper/p9219>. .978-85-7600-397-7.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas** v. 4, p. 12–20, 2010.

FOROUZANFAR, M. *et al.* In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology** v. 73, n. 4, p. 480–487, 2010.1879-3231 (Electronic)n0093-691X (Linking).

HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. S. Lactic acid production by *L. curvatus* in sugarcane molasses Material e Métodos. **Semina: Ciências Agrárias** v. 24, n. 1, p. 133–142, 2003.

HOMMA, Y.; ARIMOTO, Y.; MISATO, T. Effects of emulsifiers and surfactants on the protective values of sodium bicarbonate. **Journal of Pesticide Science** v. 6, p. 145–153, 1981. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1982/JP/JP82028.xml;JP8106489>.

IKONONOU, L. *et al.* Design of an efficient medium for insect cell growth and recombinant protein production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal** v. 37, n. 9, p. 549–559, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1290/1071-2690(2001)0372.0.CO;2>.1071-2690.

ISAKSSON, T.; NAES, T.. Effect of multiplicative scatter correction (MSC) and linearity improvement in NIR spectroscopy. **Applied Spectroscopy** v. 42, n. 7, p. 1273–1284,

1988.0003-7028.

JÄGER, E. Controle da liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoestearato de sorbitano. **Dissertação apresentada para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas** p. 113 , 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/13723/000652554.pdf?sequence=1>>.

JAMES M. J. **Microbiologia de Alimentos 6ª Ed.** [S.l: s.n.], 2005. 712 p. Disponível em: <<http://www.editoraufv.com.br/produto/1594392/microbiologia-de-alimentos-6ed>>.

JARQUE, C. M.; BERA, A. K. A Test for Normality of Observations and Regression Residuals. **International Statistical Review / Revue Internationale de Statistique** v. 55, n. 2, p. 163 , 1987. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1403192?origin=crossref>>.03067734.

JEFFERY, G H *et al.* **Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis.** [S.l: s.n.], 1989. 696 p. 5th v. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=OzEvAQAAIAAJ>>.

JOSHI, S. *et al.* Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology** v. 99, n. 1, p. 195–199 , 2008.

JUDD, S. J.; HILLIS, P. Optimisation of combined coagulation and microfiltration for water treatment. **Water Research** v. 35, n. 12, p. 2895–2904 , 2001.0043-1354.

JUNIOR, A. B.; CRUZ, S.H. da. Descoloração de melão de cana de açúcar utilizando extrato enzimático de *Phanerochaete chrysosporium*. 2007, [S.l: s.n.], 2007.

JUNIOR, G. A. de L. Obtenção de surfactina pelo micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica) - UFPR** p. 48 , 2012.

KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from. **Time** , 1997.

KROG, N. Theoretical Aspects of Surfactants in Relation to Their Use in Breadmaking. **Cereal Chemistry** v. 58, n. 3, p. 158–164 , 1981.

LIN, S. C. *et al.* Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology** v. 60, n. 1, p. 31–38 , 1994.0099-2240 (Print)r0099-2240 (Linking).

LUTZ, A. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos.** 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008 p. 1020 versão eletrônica 1. Análise de alimentos 2. Alimentos / métodos 3. Serviços laboratoriais de saúde pública CDD 614.028.9788578110796.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 58, n. 4, p. 428–434 , 2002.0175-7598 (Print)r0175-7598 (Linking).

MAKKAR, R S; CAMEOTRA, S S. Utilization of molasses for biosurfactant production

- by two *Bacillus strains* at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists Society** v. 74, n. 7, p. 887–889 , 1997.0003-021X.
- MARIM, M. G. Obtenção de biossurfactante por *B. Subtilis* ATCC (9372) a partir de melão de cana-de-açúcar. **Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado para obtenção do título de Engenheira de Alimentos, UTFPR - Campus Campo Mourão** p. 1–51 , 2014.
- MENESES, D. PINTO DE. Produção de biossurfactante por *Aureobasidium thailandense* utilizando resíduos agroindustriais. p. 72 , 2016.
- METROHM NIRSYSTEMS. **NIR Spectroscopy: A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes.** , nº 8.108.5026EN. Herisau: [s.n.], 2013. Disponível em: <http://www.metrohmusa.com/download/NIR_Monograph.pdf>.
- MILANI, G. M. F.; FERREIRA, L.; CRUZ, S. H. *Descoloração enzimática de melão de cana de açúcar em meio líquido* . [S.l: s.n.]. , 2001
- MILLER, J.C.; MILLER, J.N.; WORSFOLD, P.J. Statistics for analytical chemists. **Analytica Chimica Acta** v. 184, n. 8, p. 337–338 , 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326700086506X%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003991409480026X>>.0-412-23730-X.
- MONTEIRO, C. S. *et al.* Um estudo da pele seca: produtos emulsionados para seu tratamento e busca de sensorial agradável para o uso contínuo. **Visão Acadêmica** v. 5, n. 2, p. 69–78 , 2004. Disponível em: <<http://www.visaoacademica.ufpr.br/v6n1/cogumelo.htm>>.
- MORAIS, I.B. S. de; ANGELIS, L. H. de. Biotensoativos : uma alternativa mais limpa para as indústrias de cosméticos. **Pós em revista do Centro Universitário Newton Paiva** n. 6, p. 186–194 , 2012.
- MOSCON, J. M. *et al.* Estudo da concentração de ácido fosfórico na hidrólise da casca de arroz para obtenção de açúcares fermentáveis. p. 1–8 , 2010.
- MYERS, D. Surfactant Science and Technology. **Igarss** n. 1, p. 369 , 2014.9780874216561.
- NETO, B. de B.; SCARMINIOS, I.S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 2ª ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003. .
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology** v. 97, n. 2, p. 336–341 , 2006.0960-8524.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova** v. 25, n. 5, p. 772–776 , 2002.0100-4042 UL - http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000500013&nrm=iso.
- PAULA, B. *et al.* Melhoria na eficiência da clarificação de suco de maracujá pela combinação dos processos de microfiltração e enzimático. **B.Ceppa** v. 22, n. 2, p. 311–324 , 2004. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/alimentos/article/viewArticle/1197>>.

PAULA, B *et al.* Microfiltração de suco de maracujá. **Xviii Congresso Brasileiro De Ciência E Tecnologia De Alimentos** p. 0–3 , 2002. Disponível em: <http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_1924.pdf>.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**. [S.l: s.n.]. , 2004

PIRÔLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. **Dissertação** , 2006.

RIAZ, A. *et al.* High-yield and high-calorific bio-oil production from concentrated sulfuric acid hydrolysis lignin in supercritical ethanol. **Fuel** v. 172, n. January, p. 238–247 , 2016.

RODRIGUES, J. A. Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova** v. 34, n. 7, p. 1242–1254 , 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000700024&lng=pt&nrm=iso&tlng=en>.0100-4042.

ROSSI, C. G. F. T. *et al.* Tensoativos: Uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Rev. Univ. Rural Sér. Ci. Exatas e da Terra** v. 25, n. 1–2, p. 59–71 , 2006.

SANTOS, D. A. *et al.* Vitamin C determination by ultraviolet spectroscopy and multiproduct calibration. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 27, n. 10, p. 1912–1917 , 2016.

SANTOS, G. L. dos; GEMMER, R. E.; OLIVEIRA, E. C. Análise De Açúcares Totais, Redutores E Não- Redutores Em Refrigerantes Pelo Método Titulométrico De Eynon-Lane. **Destques Acadêmicos** p. 186–197 , 2016.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry** v. 36, n. 8, p. 1627–1639 , 1964.0003-2700.

SAXENA, R.C.; ADHIKARI, D.K.; GOYAL, H.B. Obtenção De Açúcares Fermentescíveis a Partir Da Casca De Laranja E Bagaço De Cana-De-Açúcar. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** p. 167–178 , 2009.

SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova** v. 26, n. 5, p. 726–737 , 2003.

SCHOLFIELD, C. R. Composition of soybean lecithin. **Journal of the American Oil Chemists Society** v. 58, n. 10, p. 889–892 , 1981.0003-021X.

SELLA, S. R. B. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications - a review. **Critical reviews in biotechnology** v. 8551, n. March, p. 1–13 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24963702>>.10.3109/07388551.2014.922915.

SIRIPONG, P. *et al.* Phosphoric acid pretreatment of *Achyranthes aspera* and *Sida acuta* weed biomass to improve enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology** v. 203, p. 303–308 , 2016.

SOBRINHO, H. B. de S. Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo

custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. **Dissertação** p. 89 , 2007.

STAHL, M. A. Estruturação De Sistemas Lipídicos Com Obtenção De Gorduras Zero Trans Com Teores Reduzidos De Ácidos Graxos Saturados. **Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Aplicadas para obtenção do Título de Mestra** p. 124 , 2015.

TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; LIPS, A. Comparison of solid particles, globular proteins and surfactants as emulsifiers. **Physical Chemistry Chemical Physics** v. 10, n. 12, p. 1608 , 2008.1463-9076.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculo de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova** v. 29, n. 2, p. 338–350 , 2006.0100-4042 UL - http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200026&nrm=iso.

VALDERRAMA, L. *et al.* Proposal of a Didactic Experiment To Teach Principal Component Analysis. **Química Nova** v. 39, n. 2, p. 245–249 , 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150166>>.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W.B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova** v. 32, n. 5, p. 1278–1287 , 2009.4968449704.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W B; POPPI, R. J. Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society** v. 18, n. 2, p. 259–266 , 2007.

VALDUGA, E. *et al.* Pré-tratamentos de melão de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova** v. 30, n. 8, p. 1860–1866 , 2007.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** v. 2, n. 1–3, p. 37–52 , 1987.0169-7439.

YOUSSEF, N. H. *et al.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods** v. 56, n. 3, p. 339–347 , 2004.0167-7012 (Print)r0167-7012 (Linking).