

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**  
**CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

**FRANKLIN WILLIAN BARBOSA**

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus subtilis***

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**FRANCISCO BELTRÃO**

**2017**

FRANKLIN WILLIAN BARBOSA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus subtilis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Claudia Eugênia Castro Bravo

FRANCISCO BELTRÃO

2017



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Campus Francisco Beltrão  
***Curso de Engenharia Ambiental***



---

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**Trabalho de Conclusão de Curso – TCC2**

**PRODUÇÃO DE BIODERIVADO POR *Bacillus subtilis***

por

**FRANKLIN WILLIAN BARBOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado às 15 horas e 00 min., do dia 19 de julho de 2017, como requisito para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão. O candidato foi arguido pela Banca Avaliadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Avaliadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca Avaliadora:

---

**Prof. Dra. Denise Andréia Szymczak**  
Coordenadora do Curso de Engenharia  
Ambiental

---

**Prof. Dra. Claudia Eugênia Castro**  
Professora Orientadora

---

**Prof. Dra. Ellen Porto**  
Membro da Banca

---

**Prof. Dra. Elisete Guimarães**  
Membro da Banca

---

**Prof. Dra. Denise Andréia Szymczak**  
Professora do TCC2

**“O termo de aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso”**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por ter me dado força, sabedoria, paciência e motivação para alcançar mais este objetivo.

De forma especial, agradeço aos meus pais, Angelo e Loreci, pelo apoio incansável, a confiança, a dedicação e o amor incondicional que foi fundamental nessa caminhada.

À minha orientadora, Professora Dra. Claudia Eugênia Castro Bravo, por acreditar no meu trabalho, pelo incentivo, pelas soluções, pela ajuda em laboratório e o apoio e direcionamento durante realização deste trabalho.

À minha namorada Jaqueline, pelo seu apoio, correções, dicas e encorajamento.

Às famílias Barbosa, Frezza, Martins e Turmina, que de forma direta ou indireta fazem parte desta conquista.

À minha irmã Kelli e ao meu cunhado Cleber, pelo incentivo e apoio, e às suas filhas Iohanna e Livia pelos momentos de descontração.

À Lindair e ao Iranin pelas palavras de força, de estímulo e pelo apoio.

Aos amigos da faculdade, que me ajudaram a alcançar meu objetivo: André, Bruno, Eduardo, Felipe, Fabio, Jaqueline, Jaisson, Marcus, Tiago e Telmo.

Aos demais amigos: Adinan, Carlos, Dilson, Ezequias, Marcos e Rafael pelos momentos de força e apoio.

Aos grupos Maníaco da Serra Elétrica, 8 Balls e Parceria – FB, pelos momentos de descontração e alegria.

Aos professor Dr. Raúl Jorge Hernán Castro Gómez da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pelo incentivo da pesquisa e pela doação dos microrganismos.

Por fim, agradeço a todos os professores e servidores que contribuíram para a minha formação acadêmica e à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Francisco Beltrão, pela acessibilidade e qualidade de ensino.

## RESUMO

BARBOSA, Franklin Willian. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis***. 2017. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

Algumas espécies microbianas produzem biossurfactantes e estes apresentam vantagens quando comparados com os surfactantes químicos principalmente por serem atóxicos e biodegradáveis. Por ser produto oriundo do metabolismo microbiano, a produção de biossurfactante está relacionada à fatores que influenciam o crescimento microbiano, dentre eles estão as fontes de carbono e nitrogênio, bem como as formas de condução do processo fermentativo. Utilizando a bactéria *Bacillus subtilis*, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de biossurfactante em meios de cultura com quantidades variáveis de nutrientes, e determinar o índice de emulsão de hidrocarbonetos (Hexano e Tetracloroeto de Carbono). O índice emulsificante foi determinado pela altura da emulsão formada, sendo o seu resultado expresso em porcentagem. De acordo com o planejamento experimental fatorial  $2^{(6-2)}$ , e com base nos resultados experimentais, as condições ideais para uma alta porcentagem de emulsificação de hexano, foram evidenciadas no experimento 06, constituído pelo meio base com 2,0% de óleo de soja, 2,0 % de óleo de milho, 20,0 % glicerol, 1,0 % glicose, 0,1 % de sulfato de amônio, 2,0 % de extrato de levedura, com um índice de emulsão de 23,30%. Analisando-se os resultados obtidos através do índice emulsificante do tetracloroeto de carbono as melhores evidencias foram vistas no experimento 03, utilizando meio base mais 0,2 % de óleo de soja, 20,0 % de óleo de milho, 2,0 % glicerol, 1,0 % glicose, 1,0 % de sulfato de amônio, 2,0 % de extrato de levedura, obtendo-se uma emulsão de 62,20%, ambos o crescimento se deu por crescimento bacteriológico por 48 horas a 30° C e incubados em mesa agitado a 200 rpm e com controle de temperatura a 30° C por 144 horas. Sendo assim, os resultados apresentados nos mostram que a bactéria *Bacillus subtilis* demonstrou potencial para a produção de biossurfactante.

**Palavras-chave:** Índice emulsificante. Hexano. Tetracloroeto de Carbono.

## ABSTRACT

BARBOSA, Franklin Willian. **Biosurfactants production by *Bacillus subtilis***. 2017. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

Some microbial species produce biosurfactants and these have advantages when compared with surfactants chemicals mainly because they are not toxic and biodegradable. Why be a product from microbial metabolism, the production of biosurfactant is related to the factors influencing the microbial growth, among them are the sources of carbon and nitrogen as well as the ways of conducting the fermentation process. Using the bacterium *Bacillus subtilis*, the aim of this study was to verify the production of biosurfactant in culture media with varying amounts of nutrients, and determine the content of hydrocarbon emulsion (Hexane and Carbon tetrachloride). The emulsifying index was determined by the height of the emulsion formed, being your result expressed in percentage. According the factorial experimental planning  $2^{(6-2)}$ , and based on experimental results, the ideal conditions for a high percentage of emulsification of hexane, were highlighted in the experiment 06, constituted of the base medium with 2.0% of soybean oil, 2.0% of corn oil, 20.0% of glycerol, 1.0% glucose, 0.1% ammonium sulfate, 2.0% yeast extract, with an index of 23.30% emulsion. Analyzing the results obtained through the emulsifying index of carbon tetrachloride best evidence were seen in the experiment 03 using base medium plus 0.2% soybean oil, 20.0% corn oil, 2.0% glycerol, 1.0% glucose, 1.0% ammonium sulfate, 2.0% yeast extract, obtaining an emulsion of 62.20%, both growth was by bacteriological growth for 48 hours at 30 ° C and incubated in shaking table at 200 rpm and with temperature control at 30 ° C for 144 hours. Thus, the results presented show that the bacterium *Bacillus subtilis* demonstrated potential for the production of biosurfactant.

**Keywords:** index emulsifier. Hexane. Carbon tetrachloride.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de biossurfactante (título da figura).....	8
Figura 2 - Estrutura da surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> . ....	11
Figura 3 - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das concentrações de nutrientes em níveis médios na produção de biossurfactante. ....	21
Figura 4 - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das concentrações de nutrientes em níveis médios na produção de biossurfactante. ....	24

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação. ....	14
Tabela 2 - Delineamento experimental fatorial $2^{(6-2)}$ . ....	15
Tabela 3 - Índice de emulsificação das soluções de hexano e tetra cloreto de carbono e o biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> . ....	17
Tabela 4 - Estimativa dos efeitos das variáveis, suas interações e significância ( $p \leq 0,05$ ) para o índice de emulsificação da solução de hexano com o biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> . ....	19

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 OBJETIVO GERAL.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
3.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES .....	8
3.2 APLICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES .....	9
3.3 HIDROCARBONETOS .....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	14
4.1 MICRORGANISMO.....	14
4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
4.3 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO.....	15
4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS .....	16
4.4.1 Determinação do Índice de Emulsificação.....	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
5.1 Índice de emulsificação .....	17
6 CONCLUSÃO.....	26
7 REFERÊNCIAS .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais são tema de muitas discussões na sociedade atual, entretanto esses problemas vêm ocorrendo desde muitos anos atrás. As principais contaminações ambientais estão associadas às diferentes atividades antropogênicas. Em processos industriais, todo produto, não importa de que material seja feito ou finalidade de uso, provoca um impacto no meio ambiente, seja em função de seu processo produtivo, das matérias-primas que se consome, ou devido ao seu uso ou disposição final (CHEHEBE, 1997).

A contaminação ambiental em consequência do aumento das atividades industriais vem se tornando uma grande preocupação mundial. Os principais causadores desta contaminação são produtos químicos, principalmente compostos orgânicos, como é o caso dos hidrocarbonetos, os quais são utilizados amplamente pelas indústrias. Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos constituídos basicamente por átomos de carbono e hidrogênio, os quais se apresentam ligados entre si. São facilmente encontrados em indústrias, na fabricação de combustíveis, plásticos, parafinas, entre outros (FOGAÇA, 2014). Desta forma, existem algumas legislações que dispõem sobre os impactos ambientais causados por hidrocarbonetos e, a partir daí, pesquisas são realizadas com intuito de restaurar a qualidade ambiental, através da remoção de hidrocarbonetos utilizando-se processos químicos, físicos e biológicos (SCHNEIDER et al., 2011).

Com a necessidade de recuperar ou remediar os ambientes contaminados, métodos e tecnologias vêm sendo pesquisadas, com destaque aos processos biológicos. A biorremediação é uma abordagem que tem sido usada para recuperar o solo e águas contaminadas, acelerando os processos naturais de biodegradação, promovendo uma atenuação natural dos contaminantes (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Os biossurfactantes são moléculas anfífilas (tensoativas) sintetizadas por microrganismos principalmente durante o seu crescimento em substratos imiscíveis em água, fornecendo uma alternativa aos surfactantes convencionais preparados quimicamente (DE ANDRADE; OLIVEIRA NETO; DE ALMEIDA, 2016). Devido à sua diversidade estrutural (glicolípidos, lipopeptídeos, ácidos graxos, etc.), baixa toxicidade e biodegradabilidade estas moléculas podem ser amplamente utilizadas em indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos como emulsionantes, humectantes, conservantes e detergentes. O emprego de

biossurfactantes tem chamado a atenção de pesquisadores devido à sua versatilidade em aplicações como agente emulsificante, surfactante e antimicrobiano (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes desempenham um papel importante na biorremediação de ambientes impactados, pois possibilitam a emulsão e aumento da solubilidade dos compostos hidrofóbicos, disponibilizando-os para a biodegradação (GARBINO, 2013).

Os surfactantes produzidos por microrganismos podem ser obtidos através dos processos de fermentação, os quais são procedimentos simples e de baixo custo. Açúcares e óleos são fontes de carbono adequadas para a obtenção de tensoativos ecologicamente seguros (SARUBBO; DE LUNA; TAKAKI, 2006).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência de parâmetros nutricionais na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir de biossurfactante por *Bacillus Subtilis* sobre influência de parâmetros nutricionais em meios de cultura com quantidade variáveis de nutrientes.

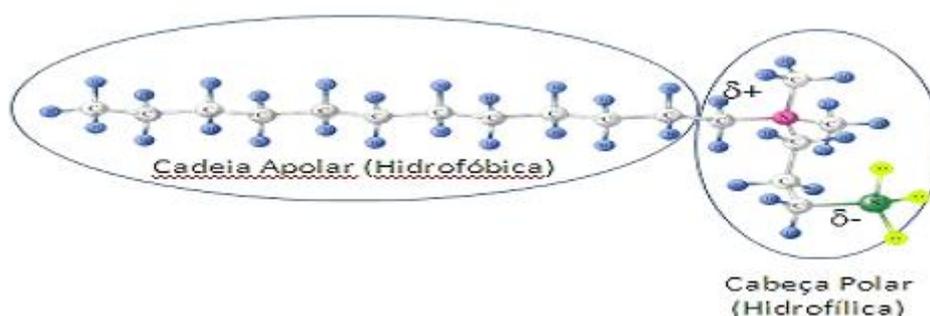
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito e interações das concentrações de diferentes nutrientes na produção de biossurfactante;
- Determinar o índice de emulsificação com diferentes hidrocarbonetos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Segundo Shreve e Brink (2014), surfactante abrange qualquer composto que modifica a tensão superficial entre dois líquidos. São moléculas que possuem duas partes, uma hidrofílica e outra hidrofóbica, o que os representam como moléculas anfipáticas. Suas divisões polar e apolar se devem a uma porção iônica, não-iônica ou anfotérica e outra porção composta por uma cadeia hidrocarbonada, respectivamente (Figura 1). Grande parte dos surfactantes comercializados são sintetizados a partir de derivados do petróleo o que é preocupante, ao meio ambiente. Desta forma, buscam-se estudos de surfactantes naturais capazes de serem aplicados como alternativas pelas indústrias (NITSCHKE, PASTORE, 2002).



**Figura 1 - Molécula de biossurfactante (título da figura).**

**Fonte:** Departamento de Química - UFMG. Disponível em: [zeus.qui.ufmg.br/qgeral/?attachment\\_id=558](http://zeus.qui.ufmg.br/qgeral/?attachment_id=558)

Sendo assim, caracterizam-se como sendo surfactantes biológicos àqueles com propriedades tensoativas semelhantes aos surfactantes sintéticos. No entanto, os surfactantes biológicos são favorecidos no quesito toxicidade, onde este, portanto, apresenta-se menos tóxico em relação aos sintéticos (DE FRANÇA et al., 2015).

Biossurfactantes tem a origem de algumas bactérias, fungos e leveduras por meio da biodegradação de matérias primas renováveis, um composto com característica anfipática, agindo como emulsificantes de hidrocarbonetos, são polímeros, que possibilitam a formação de micelas que se acumulam na interface de líquidos de diferentes polaridades como a água e o óleo. Além disso, os biossurfactantes diminuem a tensão superficial, evitando assim a formação de pontes de hidrogênio e as interações hidrofílicas e hidrofóbicas (BICCA et al.,

1999; EHRHARDT; SECATO; TAMBOURGI, 2015).

Para De Luna et al. (2008), a produção de biossurfactantes vem sendo uma das mais importantes estratégias para a obtenção de compostos compatíveis com o meio ambiente, ao fato de apresentarem pequenas alterações nas condições ambientais. Sendo que isso vem ocorrendo a partir de novas legislações que estão sendo adotadas para o controle do meio ambiente, onde um dos objetivos é a substituição de produtos não biodegradáveis por substâncias que agredem menos o ambiente, como é o caso dos biossurfactantes.

Como os biossurfactantes demonstram vantagens sobre os surfactantes sintéticos, tais como a baixa toxicidade e biodegradabilidade, o campo de aplicação industrial é bastante amplo tanto na utilização em indústria alimentícia, em indústrias de produtos farmacêuticos, na produção de cosméticos, na agricultura, em indústrias ambientais e na indústria petroquímica (PINTO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2015).

### 3.2 APLICAÇÃO E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Com a crescente preocupação ambiental e o desenvolvimento da biotecnologia, o uso de microrganismos para a produção de biossurfactantes se torna uma estratégia relevante para a obtenção de compostos compatíveis com o meio ambiente (DE ALMEIDA, 2015; DE ANDRADE, 2013). A utilização de biossurfactantes vem tornando-se uma das alternativas de substituição de surfactantes sintéticos. Além de gerarem menor impacto ambiental, devido a sua biodegradabilidade, possuem diversidade estrutural e baixa toxicidade (EHRHARDT et al., 2015).

A aplicação dos biossurfactantes no controle da poluição provocada por hidrocarbonetos derivados do petróleo vem se destacando. Resultados experimentais na produção de biossurfactante por *Candida bombicola* realizados por Freitas e colaboradores (2015) mostraram-se promissores para o controle da poluição ambiental provocada por petróleo e derivados no meio terrestre e aquático.

Além de utilizados na área ambiental, os biossurfactantes estão sendo amplamente estudados para sua aplicação no setor industrial, devido ao fato de terem sido apontados como potentes insumos nesta área. Mas para que isso seja possível é necessário que o composto apresente estabilidade e manutenção de suas características em condições extremas, associadas a esses processos (BARROS et al., 2008). Na indústria alimentícia, há estudos de

biossurfactantes produzidos por *Candida utilis* como agente emulsificante em maioneses. De acordo com a Portaria nº 540/97, um agente emulsificante (ou emulsionante) é toda substância capaz de formar ou manter uma mistura uniforme entre duas ou mais fases imiscíveis no alimento (BRASIL, 1997). Isto é, são agentes anfipáticos capazes de alterar as propriedades dos alimentos para que estes se misturem, pois os biossurfactantes possuem uma extremidade polar e outra apolar, podendo atuar como emulsificante (CAMPOS et al., 2015).

Para a produção de biossurfactantes podem ser utilizados microrganismos como bactérias, leveduras ou fungos filamentosos. Podem ser classificados em glicolipídeos, fosfolipídios, lipossacarídeos, ácidos graxos, lipídios neutros e lipopeptídeos (COLLA, COSTA, 2003).

Apesar de possuírem vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, os surfactantes naturais ou biossurfactantes possuem alto custo de produção pois utilizam como substrato, fontes nutritivas de custo elevado. Entretanto, o custo pode ser reduzido se utilizadas fontes alternativas de nutrientes com baixo custo e que são facilmente disponibilizados (NITSCHKE, PASTORE, 2002; DE ANDRADE, 2013, BEATTO, JÚNIOR, 2014).

De acordo com Dos Santos e Júnior (2012), para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, podem ser utilizados desde resíduos de glicerol oriundos da síntese de biodiesel até resíduos das indústrias de alimentos. Desta forma, a produção de biossurfactantes torna-se mais barata e o processo mais sustentável. De França et al. (2015), destacaram como potentes fontes de carbono na produção de biossurfactantes, o óleo de girassol e o glicerol.

Os microrganismos estudados que se adequam ao setor industrial para síntese de biossurfactantes são os microrganismos do gênero *Bacillus*, pelo qual produz surfactina, um lipopeptídeo bastante eficaz na redução da tensão superficial da água e na tensão interfacial de sistemas água-óleo (OLIVEIRA et al, 2015). É uma molécula composta de um heptapeptídeo cíclico (Glu-Leu-Dleu-Val-Asp-DLeu-Leu) ligada a uma molécula de ácido graxo beta-hidróxi contendo 13 a 15 carbonos (Figura 02) (BARROS et al., 2007).



água (açúcar e álcool) ou insolúvel, como é o caso dos óleos vegetais (CARA, 2009). Alguns fatores podem influenciar na produção de biossurfactante, tais como a escolha da fonte de carbono, algumas possíveis limitações nutricionais e fatores abióticos: pH, temperatura, agitação e aeração (PACHECO, 2008).

Aguiar e colaboradores (2015), relatam a produção de biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum* nas condições de cultivo em agitação de 200 rpm, 30°C por 72 h, utilizando três meios minerais: NaCl, extrato de levedura e peptona; e,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KM}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  e EDTA. O melhor resultado obtido foi a partir do terceiro meio com a cepa de *Bacillus subtilis*, tendo a tensão superficial de 28,54 Mn/m.

### 3.3 HIDROCARBONETOS

Hidrocarbonetos são compostos orgânicos com somente dois elementos, o carbono e o hidrogênio ( $\text{C}_x\text{H}_y$ ), divididos em dois grupos: aromáticos e alifáticos. Os hidrocarbonetos aromáticos possuem pelo menos um anel aromático, enquanto que os alifáticos são todos os demais com características oleosas, o que, portanto, caracterizam as nomenclaturas destes grupos. Dentro do grupo dos alifáticos encontram-se vários subgrupos que se caracterizam pelo tipo de cadeia e ligação. Os alcanos, por exemplo, são compostos de cadeia aberta com ligações simples (Hexano), enquanto os alcenos possuem ligações duplas (Eteno), os alcinos ligações triplas (1-Butino) e os alcadienos duas ligações duplas (but-1,3-dieno). A diferença, portanto, do grupo dos aromáticos está na presença de anéis aromáticos, ou seja, ciclos planos com seis átomos de carbono (FONSECA, 2013).

A formação dos hidrocarbonetos alifáticos pode ocorrer a partir de razões naturais ou por ações antrópicas, como derramamento de petróleo, combustão parcial do petróleo e seus derivados e, queimadas que acontecem em florestas (DE CASTRO et al., 2015). Os hidrocarbonetos alcanos são compostos apolares e utilizados como solventes para dissolução de outros elementos apolares, como matéria-prima, em empresas, para a síntese de compostos orgânicos, esses hidrocarbonetos também são encontrados no petróleo (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013).

A origem do petróleo se dá pelo rompimento térmico de moléculas orgânicas complexas, é uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, além de outras

substâncias como enxofre, oxigênio, nitrogênio e constituintes organometálicos complexados com níquel e vanádio (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

Derivados do petróleo, como a gasolina, compreende centenas de hidrocarbonetos de variadas estruturas e diferentes grupos funcionais, que variam desde compostos mais simples como hexano e pentano até as substâncias mais complexas como os naftenos (CAMPOS; LEONTSINIS, 1990). O hexano é um solvente alifático, líquido incolor com odor característico e insolúvel em água e apresenta hidrocarbonetos isômeros com 6 átomos de carbono e é obtido por destilação de frações do petróleo (JURAS, 2005).

Já os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compõem um grupo de compostos que possuem dois ou mais anéis aromáticos. A partir do peso molecular pode se classificar em duas classes os HPAs: de baixo peso molecular com dois ou três anéis aromáticos, e os de alto peso molecular com quatro a sete anéis aromáticos. Estes elementos, bem como seus oriundos nitratos e oxigenados, tem uma vasta distribuição e compõem misturas complexas em todos os compartimentos ambientais (NETTO et al., 2000; CELINO et al., 2006).

Esse grupo de substâncias são artefatos de processos de combustão incompleta de matéria orgânica a diferentes temperaturas e pressões. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem atingir regiões distantes de sua fonte, sendo seu transporte feito em forma de material particulado fino por meio aquoso e são considerados poluentes orgânicos precursores de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos (MEIRE et al., 2007).

Grande parte dos solventes clorados voláteis pertencem ao grupo dos hidrocarbonetos clorados, que dividem-se em hidrocarbonetos clorados alifáticos e hidrocarbonetos clorados aromáticos. São líquidos incolores, solúveis em solventes orgânicos, capazes de atravessarem membranas biológicas e distribuírem-se nos organismos vivos. Desta forma, oferecem riscos ao ar, a água, ao solo e ao sedimento (DE TOLEDO SALGADO; MARONA, 2004). O composto tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) é insolúvel em água e em solventes polares, pois são compostos de espécie apolar (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013).

O tetracloreto de carbono por ser quimicamente estável, é degradado lentamente pela natureza, portanto, fica acumulado por um longo período no ambiente, após ser liberado por processos de limpeza de peças metálicas, lavagem a seco, indústria química e/ou por ações antrópicas (DE TOLEDO SALGADO; MARONA, 2004).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRORGANISMO

A bactéria *Bacillus subtilis* utilizada nesta pesquisa foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Raúl Jorge Hernán Castro Gómez da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e foi mantida em tubos de ensaio contendo meio de cultura nutritivo, sob refrigeração a 4 °C, passando por repiques periódicos para manter o microrganismo ativo.

### 4.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O planejamento experimental fatorial  $2^{(6-2)}$  foi aplicado para determinar a influência no efeito e interações das concentrações de diferentes nutrientes na produção de biossurfactante por *B. subtilis*. As variáveis foram estabelecidas em dois níveis de variação codificados como -1 (mínimo) e +1 (máximo). A Tabela 1 mostra a matriz do delineamento experimental  $2^{(6-2)}$  e os níveis das variáveis estudadas.

As variáveis independentes estudadas no delineamento experimental fatorial  $2^{(6-2)}$  foram: óleo de soja ( $X_1$ ), óleo de milho ( $X_2$ ), glicerol ( $X_3$ ), glicose ( $X_4$ ), sulfato de amônia ( $X_5$ ) e extrato de levedura ( $X_6$ ). A variável dependente (resposta) foi o índice de emulsificação.

**Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação.**

Variáveis	Unidade	Código	Níveis (-)	Níveis (+)
<b>Óleo de soja</b>	mL 100 mL <sup>-1</sup>	X <sub>1</sub>	0,2	2
<b>Óleo de milho</b>	mL 100 mL <sup>-1</sup>	X <sub>2</sub>	2	20
<b>Glicerol</b>	mL 100 mL <sup>-1</sup>	X <sub>3</sub>	2	20
<b>Glicose</b>	g 100 mL <sup>-1</sup>	X <sub>4</sub>	1	10
<b>Sulfato de amônio</b>	g 100 mL <sup>-1</sup>	X <sub>5</sub>	0,1	1
<b>Ext. de levedura</b>	g 100 mL <sup>-1</sup>	X <sub>6</sub>	0,2	2

Fonte: própria.

A Tabela 2 mostra os dezesseis experimentos de acordo com o programa computacional *Statistica* 8.0.

**Tabela 2 - Delineamento experimental fatorial 2(6-2).**

Experimentos	X1	X2	X3	X4	X5	X6
01	0,2	2,0	2,0	1,0	0,1	0,2
02	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	0,2
03	0,2	20,0	2,0	1,0	1,0	2,0
04	2,0	20,0	2,0	1,0	0,1	2,0
05	0,2	2,0	20,0	1,0	1,0	2,0
06	2,0	2,0	20,0	1,0	0,1	2,0
07	0,2	20,0	20,0	1,0	0,1	0,2
08	2,0	20,0	20,0	1,0	1,0	0,2
09	0,2	2,0	2,0	10,0	0,1	2,0
10	2,0	2,0	2,0	10,0	1,0	2,0
11	0,2	20,0	2,0	10,0	1,0	0,2
12	2,0	20,0	2,0	10,0	0,1	0,2
13	0,2	2,0	20,0	10,0	1,0	0,2
14	2,0	2,0	20,0	10,0	0,1	0,2
15	0,2	20,0	20,0	10,0	0,1	2,0
16	2,0	20,0	20,0	10,0	1,0	2,0

Fonte: própria.

#### 4.3 PREPARO DO INÓCULO E INOCULAÇÃO

O preparo do inóculo se deu por meio do crescimento da bactéria em meio de cultura nutritivo, incubada em estufa bacteriológica por 48 horas a  $30^{\circ}\text{C}\pm 2$ . Após esse período, com auxílio de alça de platina, foi transferida para um erlenmeyer contendo 150 mL de caldo nutritivo previamente esterilizado. Foi incubada em mesa agitadora (shaker) a 200 rpm e com controle de temperatura a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

Após esse período alíquotas de 1% (v/v) do inóculo foram transferidas para os dezesseis experimentos contendo as variáveis independentes: óleo de soja (X1), óleo de milho (X2), glicerol (X3), glicose (X4), sulfato de amônio (X5) e extrato de levedura (X6) diluídas em 100 mL de água destilada. Cada variável independente foi adicionada ao meio de acordo

com as concentrações contidas na tabela 2, estabelecidas pelo planejamento fatorial obtido pelo programa computacional *Statistica 8.0*. Após esse procedimento os erlenmeyers foram incubados em mesa agitadora (shaker) a 200 rpm e com controle de temperatura a 30°C por 144 horas, para posterior realização das análises laboratoriais (FONTES et al., 2008).

#### 4.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

##### 4.4.1 Determinação do Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado seguindo a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987). Transferiu-se 2 mL do meio fermentado centrifugado para tubos de ensaio e acrescentou-se 2 mL de hexano. A mistura foi agitada em agitador vórtex por 2 minutos. Em outros tubos de ensaio, transferiu-se 2 mL do meio fermentado centrifugado e acrescentou-se 2 mL de tetracloreto de carbono e a mistura foi agitada em agitador vórtex por 2 minutos.

Após 24 horas de repouso dos tubos de ensaio com a mistura, a porcentagem do índice emulsificante (formação de emulsão) foi calculado de acordo com a Equação 1.

$\text{Índice de emulsificação (\%)} \text{ IE} = \frac{He}{Ht} \times 100$	(Equação 1)
---	-------------

Onde:

*He* = altura de emulsão (cm).

*Ht* = altura total da solução (cm).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Os resultados obtidos neste estudo, levando em consideração as condições experimentais, mostraram que em ambas as soluções testadas com os hidrocarbonetos hexano e tetracloreto de carbono, apresentaram atividade emulsificante. A Tabela 3 mostra os resultados do índice de emulsificação das soluções com hexano e tetracloreto de carbono com o biossurfactante produzido por *B. subtilis*.

**Tabela 3 - Índice de emulsificação das soluções de hexano tetracloreto de carbono e o biossurfactante produzido por *B. subtilis*.**

Variáveis Independentes							Variável dependente	Variável dependente
Ex	X1	X2	X3	X4	X5	X6	Índice de emulsificação (%) Hexano	Índice de emulsificação (%) Tetracloreto de carbono
01	0,2	2,0	2,0	1,0	0,1	0,2	0,25	12,50
02	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	0,2	11,10	51,10
03	0,2	20,0	2,0	1,0	1,0	2,0	11,60	62,20
04	2,0	20,0	2,0	1,0	0,1	2,0	0,20	11,10
05	0,2	2,0	20,0	1,0	1,0	2,0	17,80	50,20
06	2,0	2,0	20,0	1,0	0,1	2,0	23,30	50,10
07	0,2	20,0	20,0	1,0	0,1	0,2	0,20	0,20
08	2,0	20,0	20,0	1,0	1,0	0,2	0,30	0,20
09	0,2	2,0	2,0	10,0	0,1	2,0	0,20	50,00
10	2,0	2,0	2,0	10,0	1,0	2,0	0,20	0,40
11	0,2	20,0	2,0	10,0	1,0	0,2	0,20	0,20
12	2,0	20,0	2,0	10,0	0,1	0,2	0,20	0,20
13	0,2	2,0	20,0	10,0	1,0	0,2	0,20	0,30
14	2,0	2,0	20,0	10,0	0,1	0,2	0,20	0,30
15	0,2	20,0	20,0	10,0	0,1	2,0	0,20	0,20
16	2,0	20,0	20,0	10,0	1,0	2,0	0,20	0,30

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, o índice de emulsificação da solução com hexano e o biossurfactante produzido por *B. subtilis*, variou entre 0,20% a 23,30%, sendo que a condição que evidenciou a maior capacidade emulsificante do biossurfactante na solução com hexano foi encontrado no experimento 06, com valores de 23,30% de índice de emulsificação, seguido pelos experimentos 05, 03, 02 com índices emulsificantes de 17,80%; 11,60% e 11,10%, respectivamente. Os menores índices de emulsificação foram encontrados nos experimentos 01, com 0,25% de índice de emulsificação; experimentos 04, 07, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 com 0,20% de índice de emulsificação e experimento 08 com 0,30% de índice de emulsificação.

A condição observada como a mais favorável para a produção de biossurfactante (experimento 06) teve o meio de cultura constituído de 2,0% de óleo de soja, 2,0% de óleo de milho, 20,0% de glicerol, 1,0% de glicose, 0,1% de sulfato de amônio e 2,0% de extrato de levedura.

Já o índice de emulsificação da solução com tetracloreto de carbono com o biossurfactante produzido por *B. subtilis*, foi maior quando comparado com o índice de emulsificação da solução com hexano (23,30%) e variou de 0,20% a 62,20%, sendo que a condição que evidenciou a maior capacidade emulsificante do biossurfactante na presença de tetracloreto de carbono foi encontrado no experimento 03, com valores de 62,20% de índice de emulsificação, seguido pelos experimentos 02, 05, 06 e 09 com índice de emulsificação de 51,10%, 50,20%, 50,10% e 50,00%, respectivamente. Índices de emulsificação mais baixos foram encontrados nos experimentos: 01 e 04 com 12,50% e 11,10%, respectivamente e experimentos 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 com índice de emulsificação entre 0,20% à 0,40%.

A condição que pareceu mais favorável para a produção de biossurfactante (experimento 03), teve o meio de cultura constituído de 0,2% de óleo de soja, 20,0% de óleo de milho, 2,0% de glicerol, 1,0% de glicose, 1,0% de sulfato de amônio e 2,0% de extrato de levedura.

A menor porcentagem de emulsificação apresentada pode ser justificada pela falta de nutrientes adequados para que os microrganismos possam produzir o biossurfactante (AGUIAR et al., 2015). Outros fatores que também podem influenciar na produção do biossurfactante, segundo MD-Fakruddin (2012), são: pH, aeração ou velocidade de agitação.

A Tabela 4 mostra os resultados dos efeitos das variáveis e suas significâncias para o índice de emulsificação da solução de hexano com o biossurfactante produzido por *B. subtilis*.

**Tabela 4 - Estimativa dos efeitos das variáveis, suas interações e significância ( $p \leq 0,05$ ) para o índice de emulsificação da solução de hexano com o biossurfactante produzido por *B. subtilis*.**

Variáveis	Efeitos	p
<b>Óleo de soja (X1)</b>	0,62016	0,827782
<b>Óleo de milho (X2)</b>	-5,01150	0,183774
<b>Glicerol (X3)</b>	2,29591	0,456638
<b>Glicose (X4)</b>	-7,89247	0,087888
<b>Sulfato de amônio (X5)</b>	2,10453	0,489752
<b>Extrato de levedura (X6)</b>	5,13167	0,177395
<b>X1*X2</b>	-3,46103	0,301639
<b>X1*X3</b>	0,74607	0,294176
<b>X1*X4</b>	-0,62412	0,826714
<b>X1*X5</b>	-5,13490	0,177228
<b>X1*X6</b>	-2,09564	0,491348
<b>X2*X4</b>	5,00262	0,184258
<b>X2*X6</b>	-2,27377	0,460347

Fonte: própria.

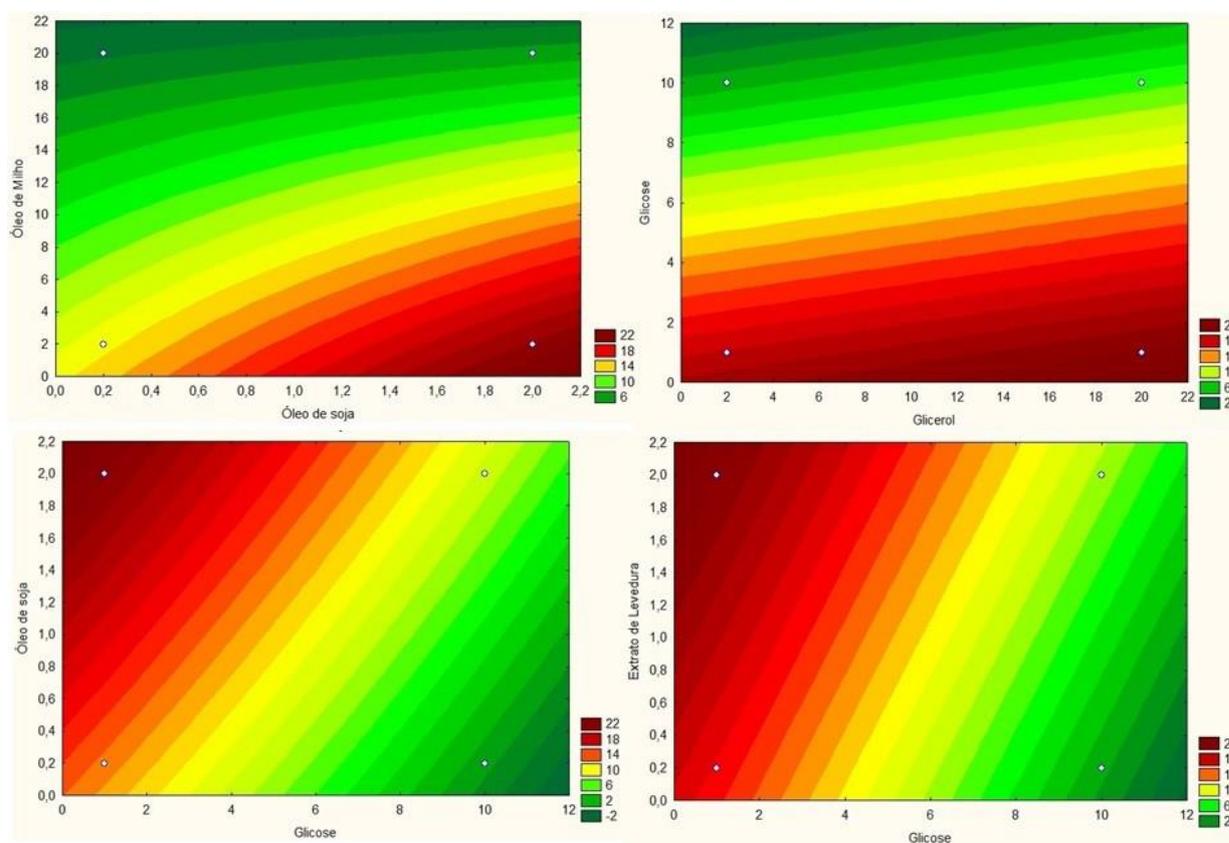
De acordo com a análise estatística da estimativa dos efeitos das variáveis para o índice de emulsificação da solução de hexano com o biossurfactante produzido por *B. subtilis*, o óleo de soja (X1= 0,62016), o glicerol (X3= 2,29591), o sulfato de amônio (X5= 2,10453) e o extrato de levedura (X6= 5,13167) apresentaram efeitos positivos na produção do biossurfactante. Em contrapartida, o óleo de milho (X2= -5,01150) e a glicose (X4= -7,8924) apresentaram efeito negativo na produção de biossurfactante. Apesar das variáveis terem apresentado efeitos positivos e negativos na produção do biossurfactante, nenhuma variável independente foi estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Após analisar os dados de forma individual, pode-se inferir que, à medida que as concentrações de óleo de soja (X1), glicerol (X3), sulfato de amônio (X5) e extrato de levedura (X6) aumentam e as concentrações de óleo de milho (X2) e glicose (X4) diminuem,

pode ocorrer um aumento na capacidade de emulsificação da solução com hexano. As interações entre as variáveis: óleo de soja e glicerol ( $X1*X3=0,74607$ ) e óleo de milho e glicose ( $X2*X4=5,00262$ ) apresentaram um efeito positivo, porém, estatisticamente não significativo ( $p \geq 0,05$ ). Todas as outras interações ( $X1*X2$ ;  $X1*X4$ ;  $X1*X5$ ;  $X1*X6$  e  $X2*X6$ ) apresentaram efeito negativo na produção do biossurfactante, contudo, estatisticamente não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

É importante ressaltar que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,94016 o que indica uma excelente relação (94,01%) dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, somente 5,99% da variação do índice emulsificante não pode ser explicado pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir um índice emulsificante maior.

Analisando os gráficos da Figura 3 pode-se reafirmar que, formulações de meio de cultura com concentrações maiores de óleo de soja, glicerol, sulfato de amônio e extrato de levedura poderiam aumentar o índice de emulsificação da solução de hexano com o biossurfactante produzido por *B. subtilis*.



**Figura 3 - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das concentrações de nutrientes em níveis médios na produção de biossurfactante.**

Fonte: Programa computacional Statistica 8.0.

Para Colla e Costa (2003) muitos microrganismos têm a capacidade de degradar ou assimilar hidrocarbonetos. Entre esses microrganismos, alguns são capazes de emulsificar estes hidrocarbonetos durante o processo da degradação do substrato. Em um estudo de estabilidade de biossurfactante, Barros e colaboradores (2008), utilizaram hidrocarbonetos através método de Cooper e Goldenberg (1987) envolvendo o composto hexano mais o biossurfactante produzido pela cepa de *Bacillus subtilis* LB5, e determinou-se um índice de emulsificação de 65%.

Zhang (2016), relata que uma das melhores fontes de carbono para o *Bacillus sp* é o glicerol. Em seu trabalho De Sousa (2011), determinou as propriedades emulsionantes do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em meio mineral suplementado com glicerol, utilizando-se o óleo de soja e o hidrocarboneto n-hexadecano como composto hidrofóbico, obtendo-se índices de 43,3% e 53,3%.

Gasparin e colaboradores (2012), em testes de índice de emulsificação realizados com óleos vegetais como fonte de carbono relataram que o óleo de milho não é uma boa fonte de carbono para produção de biossurfactante, indicando o óleo de soja como a fonte mais apropriada. De França et al (2015), indicam os óleos vegetais e o glicerol como boas fontes de carbono.

Al-Wahaibi e colaboradores (2014) descobriram que os biossurfactantes produzidos pela cepa B30 do *Bacillus subtilis* possuem uma alta atividade emulsificante contra vários hidrocarbonetos quando glicose e melão eram usados como as fontes de carbono.

A Tabela 5 mostra os resultados dos efeitos das variáveis e suas significâncias para o índice de emulsificação da solução de tetracloreto de carbono com o biossurfactante produzido por *B. subtilis*.

**Tabela 5 - Estimativa dos efeitos das variáveis, suas interações e significância ( $p \leq 0,05$ ) para o índice de emulsificação da solução com tetracloreto de carbono e o biossurfactante produzido por *B. subtilis***

Variáveis	Efeitos	p
Óleo de soja (X1)	-7,7535	0,604755
Óleo de milho (X2)	-17,4826	0,303668
Glicerol (X3)	-10,8021	0,485843
Glicose (X4)	-23,1910	0,210354
Sulfato de amônio (X5)	5,0243	0,731420
Extrato de levedura (X6)	19,9062	0,258635
X1*X2	-5,0174	0,731765
X1*X3	7,7604	0,604457
X1*X4	-4,6285	0,751218
X1*X5	-7,4132	0,619542
X1*X6	-17,4063	0,305240
X2*X4	4,9757	0,733834
X2*X6	-1,6771	0,907331

Fonte: própria.

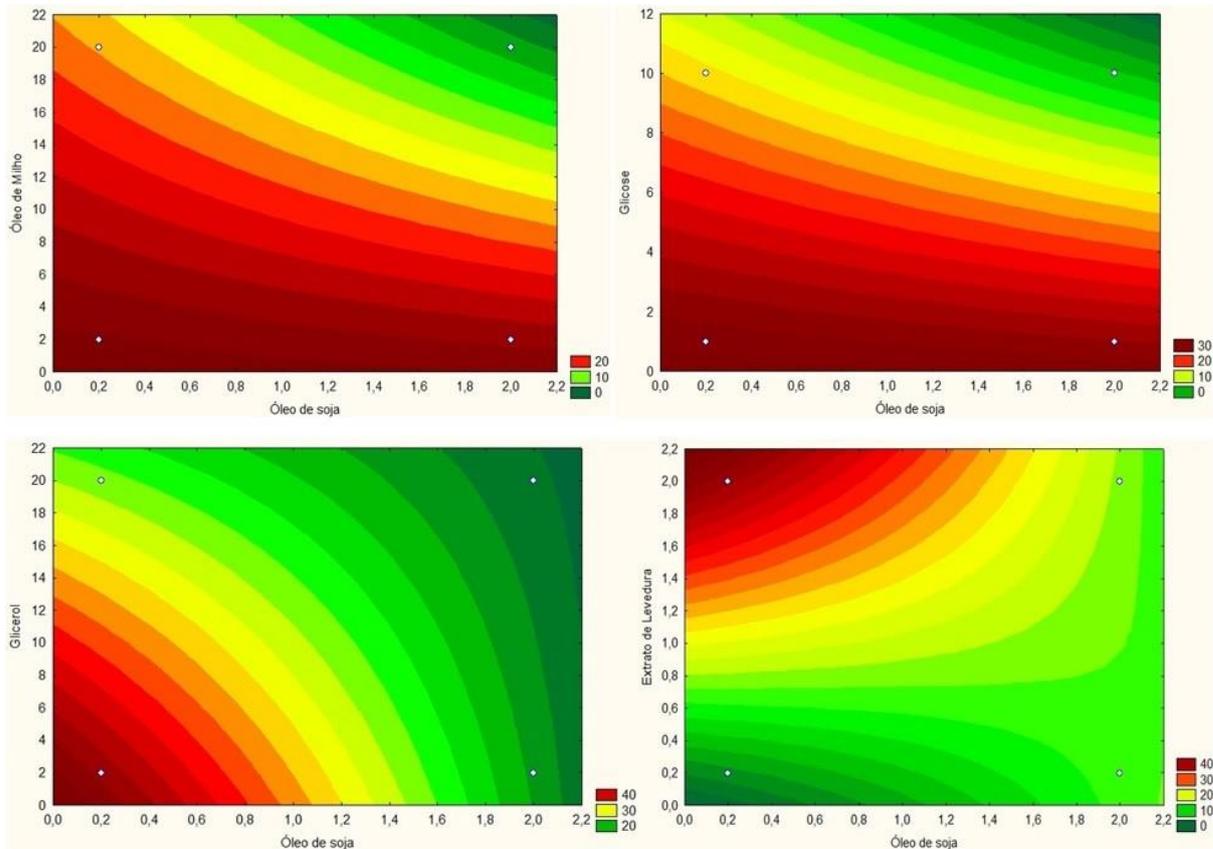
De acordo com a análise estatística da estimativa dos efeitos das variáveis para o índice de emulsificação da solução com tetracloreto de carbono e o biossurfactante produzido por *B. subtilis*, o óleo de soja (X1= -7,7535), o óleo de milho (X2= -17,4826), o glicerol (X3=

-10,8021) e a glicose ( $X_4 = -23,1910$ ) apresentaram efeito negativo na sua produção. Em contrapartida, o sulfato de amônio ( $X_5 = 5,0243$ ) e o extrato de levedura ( $X_6 = 19,9062$ ) apresentaram um efeito positivo na produção de biossurfactante. Apesar das variáveis terem apresentado efeitos positivos e negativos na produção do biossurfactante, nenhuma variável independente foi estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Após analisar os dados de forma individual, pode-se inferir que, à medida que as concentrações de óleo de soja ( $X_1$ ), óleo de milho ( $X_2$ ), glicerol ( $X_3$ ) e glicose ( $X_4$ ) diminuem pode ocorrer uma diminuição na capacidade de emulsificação da solução com tetracloreto de carbono. Em contrapartida, quando as concentrações de sulfato de amônio ( $X_5$ ) e extrato de levedura ( $X_6$ ) aumentam pode ocorrer um aumento na capacidade de emulsificação da solução com tetracloreto de carbono. As interações entre as variáveis: óleo de soja e glicerol ( $X_1 * X_3 = 7,7604$ ) e óleo de milho e glicose ( $X_2 * X_4 = 4,9757$ ) apresentaram um efeito positivo, porém, estatisticamente não significativo ( $p \geq 0,05$ ). Todas as outras interações ( $X_1 * X_2$ ;  $X_1 * X_4$ ;  $X_1 * X_5$ ;  $X_1 * X_6$  e  $X_2 * X_6$ ) apresentaram efeito negativo na produção do biossurfactante, contudo, estatisticamente não significativo ( $p \geq 0,05$ ).

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) neste caso foi de 0,85625, o que indica uma excelente relação (85,62%) dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, somente 14,38% da variação do índice emulsificante não pode ser explicado pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir um índice emulsificante maior.

Analisando os gráficos da Figura 4 pode-se verificar que, formulações de meio de cultura com concentrações maiores de óleo de soja, óleo de milho, glicerol e glicose, bem como suas interações poderiam diminuir o índice de emulsificação da solução de tetracloreto de carbono, com exceção da interação entre óleo de soja ( $X_1$ ) e glicerol ( $X_3$ ).



**Figura 4 - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das concentrações de nutrientes em níveis médios na produção de biossurfactante.**

Fonte: Programa computacional Statistica 8.0.

Os resultados dos índices emulsificantes indicam que biossurfactante produzido por *B. subtilis* possui maior afinidade com o composto tetracloreto de carbono (62,20%) quando comparado com o hexano (23,30%).

Para Barros e colaboradores (2008), o índice de emulsificação pode ser alterado pela cadeia longa ou pela massa molecular quando se utiliza compostos do grupo de hidrocarbonetos. No trabalho de Fontes e colaboradores (2012), a maior produção de biossurfactante foi detectada no meio de cultura composto por glicerol, glicerina e suco de caju suplementado com sulfato de amônio, atingindo um índice emulsificante de 53,2% quando exposto a hidrocarbonetos. Este autor destaca a importância da suplementação de nitrogênio para uma boa produção de biossurfactante, indicando o sulfato de amônio e o extrato de levedura como fontes de nitrogênio.

Os autores Rahman e Gakpe (2008), destacam a importância do uso de fontes de nitrogênio para a produção de biossurfactante e o crescimento microbiano e indicam compostos como o extrato de levedura e o sulfato de amônio como fortes fontes de azoto.

Neste estudo, levando em consideração a forma de condução deste experimento e a análise estatística, verifica-se que o efeito individual da variável óleo de milho (X2) e da variável glicose (X4) em solução com hexano (X2= -5,01150 e X4= -7,89247) e em solução com tetracloreto de carbono (X2= -17,4826 e X4= -23,1910) é negativo. O efeito individual da variável óleo de soja (X1) e da variável glicerol (X3) em solução com hexano (X1= 0,62016 e X3= 2,29591) e em solução com tetracloreto de carbono (X1= -7,7535 e X3= -10,8021) é variável, ou seja, contribui na produção do biossurfactante que terá contato com solução de hexano, mas não contribui na produção do biossurfactante que terá contato com solução de tetracloreto de carbono. Importante levar em consideração que neste caso há interação positiva entre X1\*X3 (7,7604) em solução de tetracloreto de carbono. O efeito individual da variável sulfato de amônio (X5) e da variável extrato de levedura (X6) em solução com hexano (X5= 2,10453 e X6= 5,13167) e em solução com tetracloreto de carbono (X5= 5,0243 e X6= 19,9062) é positiva. Portanto, ambas as variáveis (sulfato de amônio e a extrato de levedura) servem como fontes de nitrogênio na formulação do meio de cultura para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais e com base nos resultados, a bactéria *Bacillus subtilis* demonstrou potencial para produção de biossurfactante. Dentro do intervalo estudado, as condições ideais para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* foram as utilizadas no experimento 03 constituído por: meio base (nitrato de amônio 0,1%, fosfato monopotássico 0,02%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,02%) adicionando-se 2% de óleo de soja; 2,0% de óleo de milho; 20,0% de glicerol; 1% de glicose; 0,1% de sulfato de amônio e 2,0% de extrato de levedura e o experimento 06 constituído por: meio base (nitrato de amônio 0,1%, fosfato monopotássico 0,02%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,02%) adicionando-se 0,2% de óleo de soja; 20% de óleo de milho; 2,0% de glicerol; 1% de glicose; 1,0% de sulfato de amônio e 2,0% de extrato de levedura incubado em mesa agitadora a 200 rpm e com controle de temperatura a 28°C por 144 horas.

Os resultados servem como base para o desenvolvimento de novas fermentações com outras fontes de carbono e diferentes níveis de variação, em substituição à glicose, que foi o nutriente que causou efeito negativo nos índices emulsificantes.

Desta forma, recomenda-se que em estudos futuros sejam considerados na formulação de meio de cultura para evidenciar índice emulsificante em solução de hexano e tetracloreto de carbono com biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* e os seguintes nutrientes: óleo de soja (indutor), glicerol (fonte de carbono) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio). O óleo de soja foi utilizado, de acordo com DECESARO et al (2013), em um estudo de meio de cultivo para produção de biossurfactante pelos microrganismos *Pseudomonas* e *Bacillus*, sendo que o melhor resultado de redução da tensão superficial foi encontrada ao utilizar-se 1% de óleo de soja como indutor; porem neste caso não foram utilizadas fontes de nitrogênio.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. Abdel-H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 305-325, 2008.
- AGUIAR, G. P. S., MARTINS, V. G., MARTINS, P. C., BOSCHERO, R. A., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Influência Do Meio Mineral Na Produção De Biossurfactantes. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 7, n. 1, p.115, 119, 2015.
- AL-WAHAIBI, Y., JOSHI, S., AL-BAHRY, S., ELSHAFIE, A., AL-BEMANI, A., SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324, 2014.
- BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723, 2005.
- BARROS, F. F. C., DE QUADROS, C. P., PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979, 2008.
- BARROS, F. F. C., MANO, M. C. R., BICAS, J. L., DIONISIO, A., QUADROS, C. P., UENOJO, M. NERI, I. A., PASTORE, G. M. Production and stability of *Bacillus Subtilis* biosurfactants using cassava wastewater in a pilot scale. **Jornal of biotechnonology**, v.131, p. 172, 2007.
- BEATTO, J. M. M.; JÚNIOR, A. E. Aplicações de biossurfactantes para a descontaminação ambiental, inibição do crescimento, agregação e adesão de bactérias. 2014.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 3, p. 231-236, 1999.

BRASIL, Portaria nº 540 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde, de 27 de outubro de 1997.

CARA, D. V. C. Produção de biossurfactante por *Flavobacterium* sp. a partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial. Universidade Federal do Rio de Janeiro, **escola de química**, p. 71, 2009.

CAMPOS, A. C.; LEONTSINIS, E. Petróleo & Derivados: obtenção, especificações requisitos de desempenho. **Ed. Técnica Ltda**, p. 94, 1990.

CAMPOS, J. M., STAMFORD, T. L. M., SARUBBO, L. A. Utilização de biossurfactante como substituto aos emulsificantes sintéticos em maioneses. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 4948-4955, 2015.

CELINO, J. J., QUEIROZ, A. F. S. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. Rem: **Revista Escola de Minas**, v. 59, n. 3, p. 266, 2006.

CHEHEBE, José Ribamar. Análise do ciclo de vida de produtos: ferramenta gerencial da ISO 14000. **Qualitymark Editora Ltda**, 1997.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A.V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 13, p. 85, 87, 2003.

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

DECESARO, A., RIGON, M. R., THOMÉ, A., & COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Quim. Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DE ALMEIDA, D. G., DA SILVA, R. C. F. S., BRASILEIRO, P. P. F., DE LUNA, J. M., SARUBBO, L. A. Utilização de planejamento experimental na produção de biossurfactante pela levedura *Candida tropicalis* a partir de resíduos industriais. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2686, 2015.

DE ANDRADE, A. S. A., OLIVEIRA NETO, N. J., DE ALMEIDA, A. F. Produção de biossurfactantes utilizando extrato aquoso da Algaroba [*Prosopis juliflora* (SW)] como substrato. **Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química - XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. ISSN: 21785600, vol. 1. 2016.

DE ANDRADE, C. J. Bioprodução de biossurfactantes, enzimas e aromas, associada à utilização de resíduos agroindustriais. V. 3, n.1, p. 16, 2013.

DE CASTRO, L. M., DA ROCHA, S. D., DA SILVA, L. M., DE OLIVEIRA, T. C. S. Aplicação de índices de diagnóstico de hidrocarbonetos alifáticos na avaliação de impacto ambiental em um dos principais afluentes da margem direita do rio Amazonas. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 346, 2015.

DE FRANÇA, Í. W. L., LEMOS, J. A. M., NOVAIS, B., LEMOS, C. S., MELO, V. M. M., SANTANA, H. B., GONÇALVES, L. R. B. Avaliação de substratos de baixo custo na produção de biossurfactantes do tipo lipopeptídeos. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2288, 2015.

DE FRANÇA, Í. W. L., LEMOS, J. A. M., NOVAIS, B., LEMOS, C. S., MELO, V. M. M., SANTANA, H. B., GONÇALVES, L. R. B. Planejamento experimental na produção de biossurfactante do tipo lipopeptídeos em biorreator de bancada. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n.2, p.2304, 2015.

DE LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SARUBBO, L. A., TAKAKI, G. M. C. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Revista Exacta**, v. 6, n. 2, p. 209, 2008.

DE SOUSA, M. Bioconversão do glicerol para produção de biossurfactantes: aplicação no preparo de emulsões. 2011.

DE TOLEDO SALGADO, P. E.; MARONA, H. R. N. Informações gerais e ecotoxicológicas de solventes clorados. **Centro de Recursos Ambientais**, v. 15, p. 60, 2004.

DOS SANTOS, R. H. Z.; JÚNIOR, A. E. Coprodução de biomassa e biossurfactantes de *Bacillus subtilis* reciclando alimentos, resíduos de biomassa e da síntese de biodiesel. 2012.

EHRHARDT, D. D.; SECATO, J. F. F.; TAMBOURGI, E. B. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1960-1965, 2015.

FOGAÇA, L. B. V., MARTINS, B. F., AMORIM, L. L. G., ALMEIDA, F. P. Comportamento da percolação de poluentes hidrocarbonetos em função da textura do solo. **In: V Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, IBEAS – Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais e de Saneamento**, Belo Horizonte/MG, 2014.

FONSECA, M. R. M. Química. **Editora: Ática**, ed. 1, n. 3, p. 42, 2013.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2093, 2008.

FONTES, G. C., RAMOS, N. M., AMARAL, P. F. F., NELE, M., COELHO, M. A. Z. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 3, p. 483, 2012.

FREITAS, B. G., ROCHA E SILVA, N. M. P., LUNA, J.M, RUFINO, R. D., SARUBBO, L. A. Estudo das propriedades do biossurfactante formulado produzido por *Candida bombicola* utilizando resíduos de baixo custo. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n.2, p. 2701-2708, 2015.

GARBINO, C. F. Caracterização e identificação de microrganismos produtores de biossurfactantes para a biorremediação de cátions metálicos. Canoas, 2013.

GASPARIN, F. G. M., MAGRI, A., NEVES, A. F., CELLIGOI, M. A. P. C. Produção de Lipase e Biossurfactante por Isolado de Efluente de Laticínio. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 28, 2012.

JURAS, I. da A. G. M. Impacto à saúde e ao meio ambiente do aumento irregular de solventes na gasolina. Câmara dos Deputados: **biblioteca digital câmara**, p.15, 2005.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n.8, p. 1250, 2013.

MD, FAKRUDDIN. Biosurfactant: production and application. **J Pet Environ Biotechnol**, v. 3, n. 124, p. 2, 2012.

MEIRE, R. O. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 2, p. 188, 2007.

NETTO, A. D. P., MOREIRA, J. C., DIAS, A. E. X. O., ARBILLA, G., FERREIRA, L. F. V., OLIVEIRA, A. S., BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. **Química nova**, vol. 23, n. 6, 2000.

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n.5, p. 772, 775, 776, 2002.

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, ed. 31, p. 63-67, 2003.

OLIVEIRA, D. W. F., BEZERRA, D. P., FRANÇA, I. W. L., SANTOS, B. N., MELO, V. M. M., GONÇALVES, L. R. B. Avaliação da produção de biossurfactantes por diferentes linhagens de *Bacillus* sp. Isoladas de solos de manguezal. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 01-07, 2015.

PACHECO, G. J. Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Tese de Doutorado**, p. 95, 2008.

PINTO, M. H., et al. Bacteria biosurfactants production kinetic evaluation. **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104, 2009.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterisation and applications of biosurfactants. **Review. Biotechnology**, v.7, n. 2, p. 363, 2008.

SARUBBO, L. A., DE LUNA, L. M., TAKAKI, G. M. C. Production and stability studies of the biemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 9, n. 4, 2006.

SCHNEIDER, J. B., FERNANDES, I. J., KIELING, A. G., CAETANO, M. O., BREHM, F. A. Caracterização de águas subterrâneas contaminadas por hidrocarbonetos como etapa inicial para sua remediação. In: **26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES-Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Porto Alegre, 2011.

SHREVE, R. N.; BRINK Jr, J. A. Indústrias de processos químicos. **Tecnologia química**, ed. 4, p. 433, Rio de Janeiro, 2014.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Microbiol. **Microbiology and molecular biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503, 2003.

ZHANG, J., XUE, Q., GAO, H., LAI, H., WANG, P. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 168, 2016.