

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ALIMENTOS
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

MARIA JARA MONTIBELLER

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE OBTIDO POR CEPAS DE *BACILLUS SUBTILIS*,
BACILLUS SP. E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PARA
APLICAÇÃO EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2014

MARIA JARA MONTIBELLER

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE OBTIDO POR CEPAS DE *BACILLUS SUBTILIS*,
BACILLUS SP. E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PARA
APLICAÇÃO EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de Tecnólogo em
Alimentos, da Coordenação de Alimentos,
da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Milléo
Almeida

PONTA GROSSA

2014



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Coordenação / Departamento de Alimentos
Tecnologia em Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR CEPAS DE
BACILLUS SUBTILIS, *BACILLUS SP.* E *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PARA
APLICAÇÃO EM EMULSÃO ALIMENTÍCIA

por

MARIA JARA MONTIBELLER

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 13 de maio de 2014 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Tecnologia em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Denise Milléo Almeida
Profa. Dr^a. Orientadora

Profa. Dr^a. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro
Membro titular

Profa. Msc. Simone Bowles
Membro titular

- O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

Dedico esse trabalho a minha mãe e a
toda sua alegria de sorriso largo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Denise Milléo Almeida pelos ensinamentos, puxões de orelha e votos de confiança nesta trajetória.

Aos meus colegas de sala, pelos incontroláveis momentos de risadas.

A todos os professores por compartilharem não apenas seus conhecimentos, mas sua sabedoria.

Aos amigos de laboratório, por zelarem pela minha integridade física.

As “meninas”, por lembrarem o que eu sempre esqueço.

A minha família, pelo apoio e amor incondicional.

A ONG SOS Alegria – Doutores Palhaços, por ajudarem a Dr^a Monti.

Aos rondonistas, pois nenhum de nós é tão bom quanto todos nós juntos.

A Douglas Rafael Costa Barduco, pelos abraços.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

MONTIBELLER, Maria Jara. **Produção, Caracterização e aplicação de biosurfactante produzido por cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* para aplicação em emulsão de clara de ovo.** 2014. 44. Trabalho de Conclusão de (Curso Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2014.

O objetivo desse trabalho foi produzir, caracterizar e aplicar os biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* e aplicar em emulsão de clara de ovo. Foram produzidos biosurfactantes por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp* (UFPEDA 450), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), segundo Fatorial 2³, tendo como variáveis o bagaço da cana de açúcar, meios Luria Bertani e Luria Bertani enriquecido. Os biosurfactantes foram caracterizados pelo índice de emulsificação, estabilidade em relação a diferentes pHs, temperaturas, concentração de NaCl, atividade antimicrobiana e a produção de biosurfactante. Os biosurfactantes foram aplicados em emulsão de clara de ovo segundo Composto Central 2 x 2 x 3 e caracterizados pelo volume da espuma, estabilidade da emulsão (CRA e IS), sinérese, pH, cor, viscosidade, microscopia óptica e espalhabilidade da espuma. O biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* apresentou maior índice de emulsificação e, do *Bacillus subtilis* e *Bacillus sp.* mostraram estabilidade em todas as concentrações de NaCl e temperatura. A atividade antimicrobiana foi verificada pelo biosurfactante produzidos pelo *Bacillus subtilis*, para todos os micro-organismos investigados. O biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* mostrou melhor estabilidade da emulsão na sinérese, maior viscosidade e menor escurecimento. O biosurfactante produzido pelo *Bacillus sp.* teve influência direta no volume da espuma da emulsão. As emulsões apresentaram coloração amarelada e pH de 7,9, promovendo dificuldade na estabilização da espuma, ocorrendo a partir de 2 horas. Menores concentrações de clara de ovo promoveram maior espalhabilidade na emulsão e influenciaram diretamente no volume da espuma e capacidade de retenção de água. A aplicação dos biosurfactantes pode ser utilizada para ampliar a estabilidade de emulsões com clara de ovo.

Palavras-chave: Clara de ovo. Tensão superficial. Emulsão. Capacidade emulsificante.

ABSTRACT

MONTIBELLER, Maria Jara. **Production, characterization and application of biosurfactant produced by strains of *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* and *Pseudomonas aeruginosa* for application in emulsion of egg white.** 2014. 44.

The aim of this study was to produce, characterize and apply biosurfactants produced by *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* and *Pseudomonas aeruginosa* and applied in emulsion of egg white. Biosurfactants were produced by *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), *Bacillus sp* (UFPEDA 450), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) second factorial 23, as variables the sugar cane bagasse, Luria Bertani and Luria Bertani enriched media. The biosurfactants were characterized by emulsification index, relative stability at different values of pH, temperatures, NaCl concentration, antimicrobial activity and production of biosurfactant. The biosurfactants were applied in emulsion of egg white according to Composto Central 2 x 2 x 3 and characterized by the volume of the foam, emulsion stability (CWR and IS), syneresis, pH, color, viscosity, optical microscopy and spreadability of the foam. The biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* presented the highest emulsification index and *Bacillus subtilis* and *Bacillus sp.* demonstrated stability in all NaCl concentrations and temperature. Antimicrobial activity was checked by the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis*, for all micro-organisms investigated. The biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* showed better emulsion stability in syneresis, higher viscosity and lower darkening. The biosurfactant produced by *Bacillus sp.* had a direct influence in the volume of the emulsion foam. The emulsions presented yellowish color and pH of 7.9, promoting difficulty in the stabilization of foam, occurring from 2 hours. Lower concentrations of egg white promoted greater spreadability in the emulsion and influenced directly on foam volume and water retention capacity. The application of biosurfactants can be used to increase the stability of emulsions with egg.

Keywords: Egg. Surface tension. Emulsion. Emulsifying capacity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|----------|---|----|
| FIGURA 1 | ANÁLISE ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO | 17 |
| FIGURA 2 | ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO DE SURFACTANTES PRODUZIDOS POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C) EM ÓLEO DE SOJA, QUEROSENE E TOLUENO..... | 26 |
| FIGURA 3 | EFEITO DA TEMPERATURA E DO TEMPO NA TENSÃO SUPERFICIAL DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C)..... | 29 |
| FIGURA 4 | EFEITO DO NaCl NA TENSÃO SUPERFICIAL DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C)..... | 32 |
| FIGURA 5 | EFEITO DO PH NA TENSÃO SUPERFICIAL DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86), <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) E <i>BACILLUS SP</i> (UFPEDA 436)..... | 36 |
| QUADRO 1 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR..... | 37 |
| FIGURA 6 | GRÁFICO DE PARETO: EFEITO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C) E DA CLARA DE OVO SOBRE O VOLUME DA ESPUMA..... | 43 |
| FIGURA 7 | GRÁFICO DE PARETO: EFEITO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C) E DA CLARA DE OVO SOBRE A CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA..... | 45 |
| FIGURA 8 | GRÁFICO DE PARETO: EFEITO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C) E DA CLARA DE OVO SOBRE O ÍNDICE DE SEDIMENTAÇÃO..... | 47 |
| FIGURA 9 | GRÁFICO DE PARETO: EFEITO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA | |

| | | |
|--------------|--|----|
| | 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C) E DA CLARA DE OVO SOBRE A SINÉRESE... | 49 |
| FIGURA 10 | GRÁFICO DE PARETO: EFEITO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) (A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) (B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (C) E DA CLARA DE OVO SOBRE O POTENCIAL HIDROGENIÔNICO..... | 51 |
| FIGURA 11 | GRÁFICO DE PROPRIEDADE REOLÓGICAS DOS BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450), <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741).. | 54 |
| FOTOGRAFIA 1 | ESTABILIDADE DA EMULSÃO SOB MICROSCOPIA ÓTICA PRODUZIDO POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) (TRATAMENTO 4)..... | 55 |
| FIGURA 12 | GRÁFICO DE PARETO:EFEITO DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86)(A), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450)(B) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741)(C) E DA CLARA DE OVO SOBRE A ESPALHABILIDADE DA EMULSÃO 5,1G E 5,1G+2G..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| TABELA 1 | PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM TRÊS PONTOS CENTRAIS APLICADO EM PROCESSO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE..... | 16 |
| TABELA 2 | PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL POR COMPOSTO CENTRAL $2 \times 2 \times 3$ EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE..... | 21 |
| TABELA 3 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86) EM TUBOS DE ENSAIOS..... | 39 |
| TABELA 4 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) EM TUBOS DE ENSAIO..... | 40 |
| TABELA 5 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) EM TUBOS DE ENSAIO..... | 41 |
| TABELA 6 | CONCENTRAÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> (UFPEDA 86), <i>BACILLUS SP.</i> (UFPEDA 450) E <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> (UFPEDA 741) EM PROCESSO FERMENTATIVO SOB AGITAÇÃO..... | 42 |
| TABELA 7 | COLORAÇÃO DA EMULSÃO DE CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE..... | 53 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 2.1. | PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOSURFACTANTE..... | 15 |
| 2.2. | CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES..... | 17 |
| 2.2.1. | Índice de emulsificação..... | 17 |
| 2.2.2. | Estabilidade da emulsão..... | 18 |
| 2.2.2.1. | Estabilidade a pH..... | 19 |
| 2.2.2.2. | Estabilidade a temperatura..... | 19 |
| 2.2.2.3. | Estabilidade a NaCl..... | 19 |
| 2.2.3. | Atividade antimicrobiana em placas de petri..... | 20 |
| 2.2.4. | Atividade antimicrobiana em tubos de ensaio..... | 20 |
| 2.2.5. | Concentração de biosurfactante..... | 20 |
| 2.3. | APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO..... | 21 |
| 2.4. | CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO DE CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE..... | 21 |
| 2.4.1. | Volume da Espuma (overrun)..... | 22 |
| 2.4.2. | Estabilidade da emulsão: capacidade de retenção de água..... | 22 |
| 2.4.3. | Estabilidade da emulsão: índice de sedimentação..... | 23 |
| 2.4.4. | Sinérese..... | 23 |
| 2.4.5. | Potencial hidrogeniônico..... | 23 |
| 2.4.6. | Análise de cor..... | 24 |
| 2.4.7. | Reologia..... | 24 |
| 2.4.8. | Microscopia ótica..... | 24 |
| 2.4.9. | Espalhabilidade da espuma..... | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 26 |
| 3.1. | ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE..... | 26 |
| 3.2. | ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH), TEMPERATURA E CLORETO DE SÓDIO (NACL)..... | 28 |
| 3.3. | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSURFACTANTES ANALISADAS EM PLACAS DE PETRI..... | 32 |
| 3.4. | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSURFACTANTES ANALISADAS EM TUBOS DE ENSAIO..... | 39 |
| 3.5. | PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE..... | 41 |
| 3.6. | EMULSÃO DE CLARA DE OVO ADICIONADO DE BIOSURFACTANTE. VOLUME DA ESPUMA..... | 42 |
| 3.7. | ESTABILIDADE DA EMULSÃO - CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA..... | 44 |
| 3.8. | ESTABILIDADE DA EMULSÃO - ÍNDICE DE SEDIMENTAÇÃO..... | 45 |
| 3.9. | SINÉRESE..... | 48 |
| 3.10. | POTENCIAL HIDROGENIÔNICO..... | 50 |
| 3.11. | COR DA EMULSÃO DE CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE... | 52 |
| 3.12. | VISCOSIDADE DA EMULSÃO..... | 53 |
| 3.13. | MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO..... | 54 |
| 3.14. | ESPALHABILIDADE DA ESPUMA..... | 56 |
| 4. | CONCLUSÃO | 59 |
| | REFERÊNCIAS | 60 |

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos, possuindo propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo produzidas química ou biologicamente. Grande parte dos surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados do petróleo. O aumento da preocupação ambiental combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente levou a procura por surfactantes naturais como alternativas aos sintéticos existentes (BUENO, 2008).

Os biosurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes abrangem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; DESAI, 1993).

Entre os surfactantes naturais estão os biosurfactantes, com propriedades biológicas aplicáveis em diferentes indústrias. Produzidos por bactérias, fungos ou leveduras, têm recebido atenção especial devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e conseqüentemente aceitabilidade ecológica. Porém ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção (GOUVEIA et al., 2003).

Sua síntese por micro-organismos ocorre durante o crescimento logarítmico e entre os produtores estão as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Candida bombicola*, *Corynebacterium insidiosum* (MULLIGAN; YOUNG; GIBBS, 2001). A qualidade e quantidade do biosurfactante produzido são influenciadas pelas concentrações de diferentes compostos químicos nos meios de cultura (fósforo, nitrogênio, magnésio, ferro e oxigênio) e condições de cultivo (GEORGIU; LIN; SHARMA, 1992).

O grande interesse pelas propriedades físico-químicas e biológicas desses surfactantes naturais pode ser explorado nas indústrias farmacêuticas, de óleos minerais e de alimentos. As propriedades de formação e estabilização de emulsões são características que influenciam na utilização pela indústria de alimentos. Entre as funções dos emulsificantes em alimentos está na promoção da estabilidade da emulsão, controle da aglomeração de glóbulos de gordura e a estabilidade de sistemas aerados (SANTOS, 2008). Estes agentes tenso-ativos se encontram aplicados na panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam nas

características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi produzir, aplicar e caracterizar os biosurfactantes produzidos por cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* e aplicar em emulsão de clara de ovo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE BIOSURFACTANTE

Foram utilizadas as cepas de bactérias *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) *Bacillus sp* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), cedidas pela Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos.

O biosurfactante foi produzido por processo fermentativo de 200 mL, segundo delineamento fatorial completo 2^3 com três pontos centrais, tendo como variáveis independentes o bagaço de cana-de-açúcar, caldo Luria Bertani (LB) e Luria Bertani (LB) enriquecido com meio salino mineral [fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) $7,0 \text{ g.L}^{-1}$, sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, glicerol 30 g.L^{-1} e sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e tampão fosfato $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 7,0] (Tabela 1). O caldo Luria Bertani tinha como composição: cloreto de sódio (NaCl) 10 g.L^{-1} , triptona 10 g.L^{-1} , extrato de levedura 5 g.L^{-1} . As variáveis de resposta analisadas foram índice de emulsificação, estabilidade em relação a diferentes pHs, temperaturas e concentração de NaCl, atividade antimicrobiana e a produção de biosurfactante.

O meio de cultivo foi autoclavado e adicionados 4% (v/v) do inóculo (10^8 células/mL) e incubados sob agitação a 150 rpm (Incubadora TE -420, São Paulo, Brasil) a temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 96 horas.

Tabela 1 - Planejamento Fatorial 2³ com três pontos centrais aplicado em processo fermentativo para produção de biosurfactante

| Tratamentos | Variáveis independentes | | | | | |
|-------------|-------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--|--------------------|
| | Bagaço cana de açúcar | | Meio Luria Bertani | | Meio Luria Bertani + Meio salino mineral | |
| | | Sinais codificados (g) | | Sinais codificados | | Sinais codificados |
| 1 | +1 | 8 | +1 | Presença | +1 | Presença |
| 2 | +1 | 8 | +1 | Presença | -1 | Ausência |
| 3 | +1 | 8 | -1 | Ausência | +1 | Presença |
| 4 | +1 | 8 | -1 | Ausência | -1 | Ausência |
| 5 | -1 | 0 | +1 | Presença | +1 | Presença |
| 6 | -1 | 0 | +1 | Presença | -1 | Ausência |
| 7 | -1 | 0 | -1 | Ausência | +1 | Presença |
| 8 | -1 | 0 | -1 | Ausência | -1 | Ausência |
| 9 | 0 | 5 | 0 | * | 0 | ** |
| 10 | 0 | 5 | 0 | * | 0 | ** |
| 11 | 0 | 5 | 0 | * | 0 | ** |

Nota:

Luria Bertani

1 -- Presença de Luria Bertani (cloreto de sódio (NaCl) 10 g.L⁻¹, triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹).

-1 – Ausência de Luria Bertani (cloreto de sódio (NaCl) 10 g.L⁻¹, triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹).

0 -- * Luria Bertani (NaCl 2 g.L⁻¹, triptona 2 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹).

Luria Bertani + Meio Salino Mineral

1 – Presença de Luria Bertani + Meio salino Mineral [fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 3,0 g.L⁻¹, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 7,0 g.L⁻¹, sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄ 7H₂O) 0,2 g.L⁻¹, glicerol 30 g.L⁻¹ e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ em pH 7,0]

-1 – Ausência de Luria Bertani + Meio salino Mineral (KH₂PO₄) 3,0 g.L⁻¹, fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) 7,0 g.L⁻¹, sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄ 7H₂O) 0,2 g.L⁻¹, glicerol 30 g.L⁻¹ e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e tampão fosfato 0,2 mol.L⁻¹ em pH 7,0]

0 -- **Luria Bertani + Meio salino Mineral: NaCl 2 g.L⁻¹, triptona 2 g.L⁻¹, extrato de levedura 1 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 0,6g.L⁻¹, K₂HPO₄ 1,14g, MgSO₄ 0,04g, (NH₄)₂SO₄ 0,2g).

Para extração do biosurfactante o caldo de fermentação foi centrifugado (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil) a 3900 rpm por 15 minutos a 4^o C±1^oC para retirada da biomassa. O sobrenadante foi acidificado até pH 2 com

HCl 6N e mantido a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para precipitação do biosurfactante. Decorrido o tempo, foi centrifugado a 3.900 rpm por 45 minutos a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, e submetido a três lavagens sucessivas por água destilada com centrifugação 3.900 rpm por 45 minutos a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

Os biosurfactantes produzidos pelos diferentes micro-organismos foram caracterizados por meio do índice de emulsificação, estabilidade em relação a diferentes pHs, temperaturas e concentração de NaCl, atividade antimicrobiana e pela produção de biosurfactante.

2.2.1. Índice de emulsificação

O índice de emulsificação (%) foi determinado após centrifugação do caldo de fermentação, a 3900 rpm por 30 minutos a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil), para retirada do sobrenadante. Em seguida foram adicionados 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (óleo de soja, querosene e tolueno) em tubos de ensaio com 4 mL do sobrenadante de fermentação e submetidos a agitação por 2 minutos, em agitador de tubos de ensaio (Vortex Mixer, modelo KMC – 1300V, Vision Scientific Co., LTD – Korea). Os resultados foram expressos em porcentagem segundo equação 1.

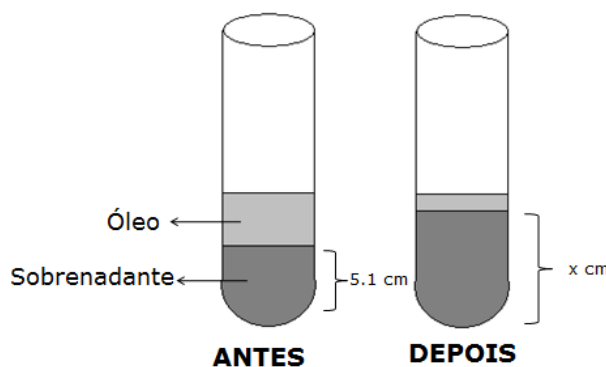


Figura 1: Análise índice de emulsificação

Fonte: Autoria própria (2014)

$$IE(\%) = \frac{x}{5,1} \times 100 \quad (1)$$

Onde,

IE (%) = índice de emulsificação

x= altura adquirida pelo menisco do sobrenadante após agitação (g)

2.2.2. Estabilidade da emulsão

Para determinação da estabilidade da emulsão foi utilizado o método de peso de gota. Neste método foi utilizada uma bureta onde se obteve o valor do raio da ponta da bureta, sendo colocado o sobrenadante com biosurfactante produzido pelos micro-organismos nos diferentes tratamentos. Na sequência foi pesada cada gota por meio de balança analítica previamente tarada. Com o desprendimento da gota, a força exercida pelo peso da gota ($m \cdot g$) se equilibra pela tensão superficial (γ) e pela multiplicação da circunferência ($2 \cdot \pi \cdot r$), da gota formada. O resultado foi expresso em $mN \cdot m^{-1}$, como apresentado na equação 2 (BEHRING et al., 2004; MONTEIRO, 2007).

$$R = \frac{mg}{2\pi\gamma} \quad (2)$$

Onde,

m = massa

g = aceleração da gravidade

π = pi

γ = constante da tensão superficial

2.2.2.1. Estabilidade em pH

Para verificar a estabilidade do biosurfactante em diferentes pHs foram produzidos 11 tubos de ensaio com 5 mL de solução (água destilada + HCl 1 M/ NaOH 1 M) obtendo pHs de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Foram pesados 0,010 mg de biosurfactante seco e adicionado 10 mL de água destilada (solução de biosurfactante com 1 mg.L^{-1}). Desta solução foram adicionados 3 mL da solução de biosurfactante (1 mg.L^{-1}) nos respectivos tubos de ensaio. O efeito do pH foi verificado por meio da tensão superficial que foi determinada pelo método do peso da gota (Item 222) e os resultados expressos em mN.m^{-1} (BEHRING et al., 2004; MONTEIRO, 2007).

2.2.2.2. Estabilidade a temperatura

A estabilidade dos biosurfactantes nas diferentes temperaturas foi analisada segundo ROCHA (2007). Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mL da solução (água destilada) e 3 mL da solução de biosurfactante (1 mg.L^{-1}) e mantidos em estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em tempos de 15, 30, 60, 90 minutos. Outro tubo de ensaio com 3 mL da solução de biosurfactante (1 mg.L^{-1}) foi submetido a processo de autoclavação, $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. A estabilidade a diferentes temperaturas foram analisadas por meio da tensão superficial, que foi determinada pelo método do peso da gota (Item 222) e os resultados expressos em mN.m^{-1} (BEHRING et al., 2004).

2.2.2.3. Estabilidade a concentrações de NaCl

A estabilidade do biosurfactante foi analisada em diferentes concentrações de NaCl (ROCHA et al., 2007). Foram adicionados 3 mL da solução de biosurfactante (1 mg.L^{-1}) em tubos de ensaio de 5 mL de solução de água destilada contendo as diferentes concentrações de NaCl 2,5%, 5%, 10%, 25%. Os tubos foram agitados em vortex por 30 segundos e submetidos à análise da tensão superficial, determinada pelo método do peso da gota (Item 222) e os resultados expressos em mN.m^{-1} (BEHRING et al., 2004).

2.2.3. Atividade antimicrobiana em placas de Petri

A atividade antimicrobiana foi determinada em placas de Petri e tubos de ensaio. Em placas de Petri a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método da Difusão em Agar. O biosurfactante foi extraído e preparado um extrato do biosurfactante (9:1), onde foram submersos discos de papéis filtro (0,6 mm de diâmetro) e mantidos em repouso por 1 hora. Os discos foram secos em estufa a $50^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 hora e colocados em placas de Petri contendo Plate Count Ágar inoculado de 0,1 mL de micro-organismos (*Bacillus cereus* (ATCC 33018), *Salmonella sp.*, *Escherichi coli* (ATCC 25922), *Bacillus sp.* (UFPEDA 191), *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter sp.* e *Staphylococcus aureus* TSB 25923). As placas inoculadas foram conduzidas a estufa (QUIMIS) a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. O tamanho do diâmetro do halo de inibição indicou a atividade antimicrobiana, sendo considerado sensível ≥ 3 mm, moderadamente sensível > 2 mm e < 3 mm e, resistente ≤ 2 mm.

2.2.4. Atividade antimicrobiana em tubos de ensaio

A atividade antimicrobiana foi avaliada em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo nutriente com 0,1 mL dos micro-organismos (*Bacillus cereus* (ATCC 33018), *Salmonella sp.*, *Escherichi coli* (ATCC 25922), *Bacillus sp.* (UFPEDA 191), *Bacillus sp.* (UFPEDA 436), *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter sp.* e *Staphylococcus aureus* (TSB 25923) e 0,1 mL do sobrenadante do caldo fermentativo, seguido de incubação a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A turvação do meio de cultivo foi avaliada em espectrofotômetro UV visível a 620 nm.

2.2.5. Concentração de biosurfactante

A concentração de biosurfactante foi determinada pelo extrato bruto adaptado (MONTEIRO,2007). O caldo de fermentação, após retirada a biomassa, foi centrifugado a 3900 rpm por 30 minutos a $4^{\circ}\text{C}\pm$ em centrífuga (Excelsa 4, modelo

280-R, Fanem – São Paulo, Brasil) e o biosurfactante foi dessecado a $50^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, até massa constante. Os resultados foram expressos em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2. 3. APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTE EM EMULSÃO DE CLARA DE OVO

A aplicação de biosurfactante em emulsão de clara de ovo foi analisado segundo delineamento experimental Composto Central $2 \times 2 \times 3$ (Tabela 2), tendo como variáveis independentes biosurfactante e clara de ovo e, as variáveis de respostas foram parâmetros do volume da espuma (overrun), estabilidade da emulsão (capacidade de retenção de água e índice de sedimentação), sinérese, potencial hidrogeniônico, cor, viscosidade, microscopia óptica e espalhabilidade da espuma.

Tabela 2: Planejamento Experimental - Composto Central $2 \times 2 \times 3$ em emulsão de clara de ovo

| Tratamentos | Variáveis independentes | | | |
|-------------|-------------------------|------|------------------------|-------|
| | Biosurfactante | | Clara de ovo | |
| | Sinais codificados (g) | | Sinais codificados (g) | |
| 1 | -1 | 0,65 | -1 | 23,60 |
| 2 | -1 | 0,65 | 1 | 41,30 |
| 3 | 1 | 1,35 | -1 | 23,60 |
| 4 | 1 | 1,35 | 1 | 41,30 |
| 5 | 1,4142 | 0,50 | 0 | 32,50 |
| 6 | -1,4142 | 1,50 | 0 | 32,50 |
| 7 | 0 | 1,00 | -1,4142 | 23,60 |
| 8 | 0 | 1,00 | 1,4241 | 45,00 |
| 9 | 0 | 1,00 | 0 | 32,50 |
| 10 | 0 | 1,00 | 0 | 32,50 |

2 .4. CARACTERIZAÇÃO DA EMULSÃO DE CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE

A emulsão de clara de ovo com biosurfactante foram analisadas segundo os parâmetros do volume da espuma (overrun), estabilidade da emulsão (capacidade

de retenção de água e índice de sedimentação), sinérese, potencial hidrogeniônico, cor, viscosidade, microscopia óptica e espalhabilidade da espuma.

2.4.1. Volume da Espuma (overrun)

A determinação do volume da espuma foi realizada pela relação entre o volume inicial da emulsão com agente biossurfactante antes da aeração e o volume de espuma formado após aeração (ROCHA et al., 2007). Os cálculos foram realizados segundo equação 3 e os resultados expressos em porcentagem.

$$\% \text{ volume de espuma} = \frac{\text{volume inicial} - \text{volume final}}{\text{volume inicial}} \times \frac{1}{100} \quad (3)$$

2.4.2. Estabilidade da emulsão: capacidade de retenção de água

A capacidade de retenção de água foi determinada pela centrifugação a 3.900 rpm por 45 minutos de 3g da emulsão, a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (REMEUF et al., 2003). O sobrenadante resultante da centrifugação foi pesado em balança (GEHAKA, modelo BK 2000, São Paulo, Brasil), obtendo o valor do soro expelido. O cálculo da capacidade de retenção de água foi realizada segundo equação 4, e os resultados expressos em porcentagem (%).

$$\text{CRA} = \frac{(S_0 - S_E)}{S_0} \times 100 \quad (4)$$

Onde,

CRA = capacidade de retenção de água (%)

S_0 = peso da emulsão utilizada (g)

S_E = peso da quantidade de soro expelido (g)

2.4.3. Estabilidade da emulsão: índice de sedimentação

O índice de sedimentação foi realizado segundo foi determinada pela centrifugação a 3.900 rpm por 45 minutos de 3g da emulsão, a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (REMEUF et al., 2003). Após centrifugação foi mantida a $7^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Decorrido esse tempo, o soro liberado foi pesado em balança (GEHAKA, modelo BK 2000, São Paulo, Brasil), para verificar sua massa. O cálculo do índice de sedimentação foi realizada segundo equação 5, e os resultados expressos em porcentagem (%).

$$IS = \frac{SL}{PE} \times 100 \quad (5)$$

Onde,

IS = Índice de sedimentação (%)

SL = peso de soro liberado (g)

PE = peso da emulsão inicial (g)

2.4.4. Sinérese

A presença de sinérese foi determinada por gravimetria utilizando becker de 250 mL e uma peneira. O volume do líquido depositado no fundo do becker, previamente tarado, foi pesado. Após 2 horas, o cálculo da porcentagem de sinérese foi realizado conforme equação 6, e os resultados expressos em porcentagem (%) foi determinada pela centrifugação a 3.900 rpm por 45 minutos de 3g da emulsão, a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (ROMERO et al., 2008).

$$\text{Sinérese (\%)} = \frac{(\text{peso líquido liberado})}{\text{peso total da amostra}} \times 100 \quad (6)$$

2.4.5. Pontencial hidrogeniônico

A medida do pH foi realizado por imersão direta do eletrodo na emulsão de clara de ovo com biosurfactante, com auxílio de peagâmetro (Digital Tec – 2 mp, Piracicaba – SP, Brasil).

2.4.6. Análise de cor

Para análise de cor da emulsão foi utilizado o colorímetro HunterLab de acordo com a escala L^* a^* b^* ou CIELAB, recomendada pela *Commission Internationale de L'Eclairage* (CIE). O sistema tri-axial ("tristimulus") de cores fornece três eixos com as coordenadas L^* , a^* e b^* para determinar a coloração da emulsão. No eixo x a coordenada a^* varia do vermelho (+ a^*) ao verde (- a^*); no eixo y , a coordenada b^* do amarelo (+ b^*) ao azul (- b^*) e o eixo z corresponde às cores que vão do branco (+ L^*) ao preto (- L^*).

2.4.7. Reologia

O comportamento reológico foi avaliado em viscosímetro Brookfield (Brookfield Engineering Laboratories/ Modelo LVT) com Spindle nº SC4- 31, utilizando uma alíquota da amostra, onde foi observada a viscosidade em função da velocidade (1 a 100 rpm), em ciclos de 10 minutos.

2.4.8. Microscopia ótica

A emulsão foi submetida à microscopia ótica (MAJLAB, modelo M ,Polkie) em objetiva e ocular de 10 x, obtendo aumento de 100 vezes. Foram fotografadas e analisadas nos tempos 0 hora, 30 minutos, 1, 2 e 3 horas e a imagem foi captada em câmera digital (Sony, DSC-W125).

2.4.9. Espalhabilidade da espuma

A espalhabilidade foi analisada com auxílio de folha de papel milimetrado, onde foram traçados os lados de uma lâmina de vidro para microscopia. Amostras de 250 mg de emulsão foram colocadas no centro de uma lâmina de vidro, posicionada sobre o desenho feito na folha de papel milimetrado. Uma outra lâmina de vidro, de peso determinado (5,1 g) foi posicionada sobre a primeira lâmina contendo a emulsão e, após 1 minuto, foi anotado os raios médios do círculo formado pelo espalhamento. O mesmo procedimento foi seguido em intervalos de 1 minuto, adicionando peso aferido de 2g foi determinada pela centrifugação a 3.900

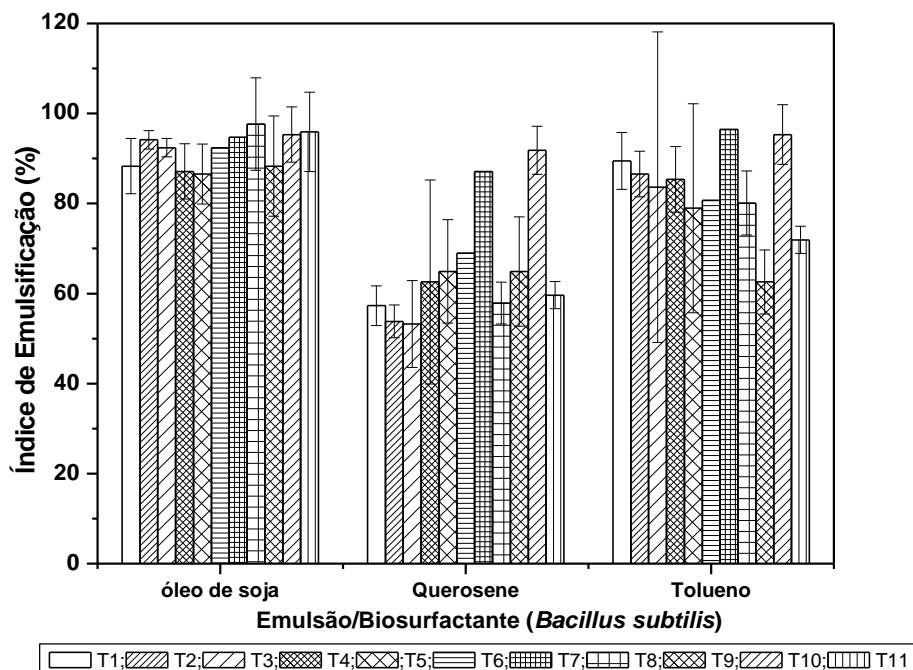
rpm por 45 minutos de 3g da emulsão, a $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (KHOURYIER;ARAMOUNI;HERAD,2005).

3. RESULTADO E DISCUSSÕES

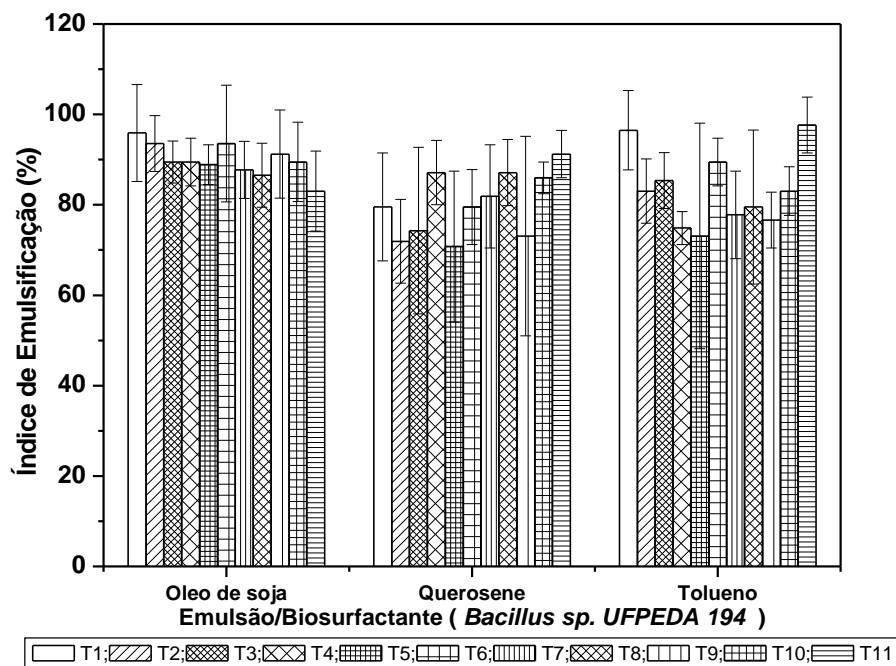
3.1. ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE

O índice de emulsificação avalia a capacidade dos biosurfactantes produzidos em emulsificar compostos insolúveis, formando emulsões estáveis (SOUZA,2007).

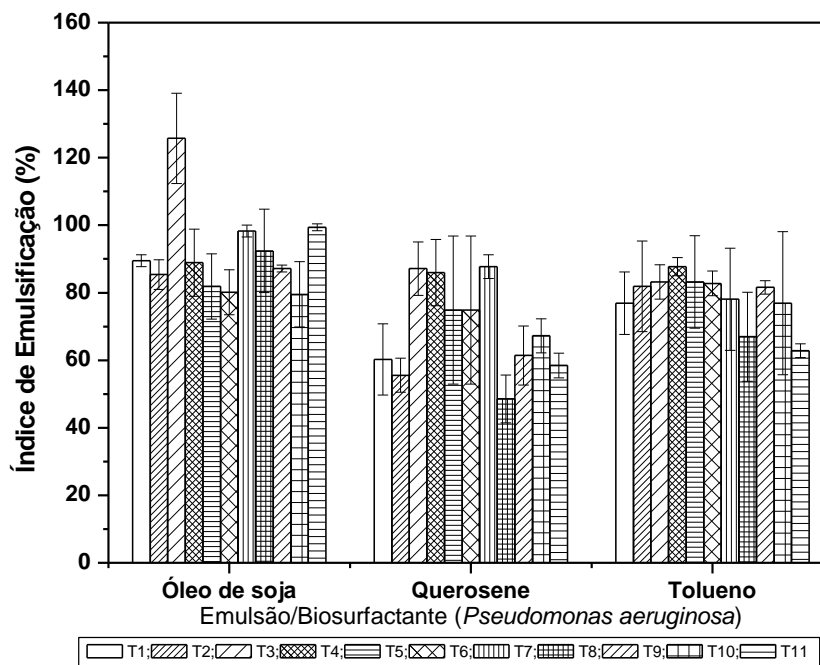
Ao final do período fermentativo, o maior índice de emulsificação foi de 126%, promovido pelo biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), no tratamento 3, em óleo de soja. O biosurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) apresentou 97,7% no índice de emulsificação em óleo de soja no tratamento 8 e o *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) mostrou 98% em tolueno, no tratamento 11 (Figura 1).



(A)



(B)



(C)

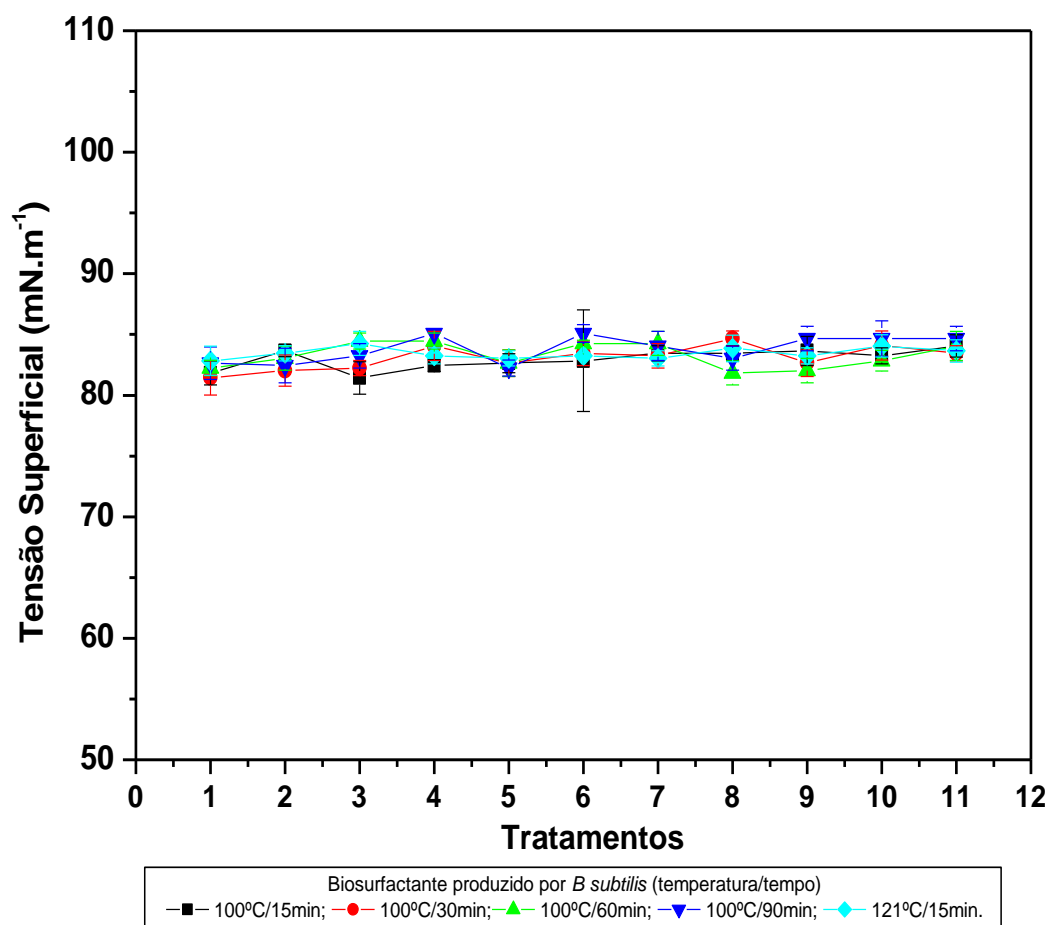
Figura 2 – Índice de emulsificação de surfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.*(UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C) em óleo de soja, querosene e tolueno.

Em outros trabalhos foi observado maior produção de biosurfactante produzido por *Bacillus sp.* tendo como fonte de carbono o glicerol (6,28 g.L⁻¹) e, maior índice de emulsificação em tolueno (62%) e o maior índice de emulsificação de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foi obtido em óleo de soja, porém com valores menores (71,79 %) no índice de emulsificação, em relação a este trabalho (BRITO; ALMEIDA, 2011) (COOPER.; GOLDENBERG,1987).

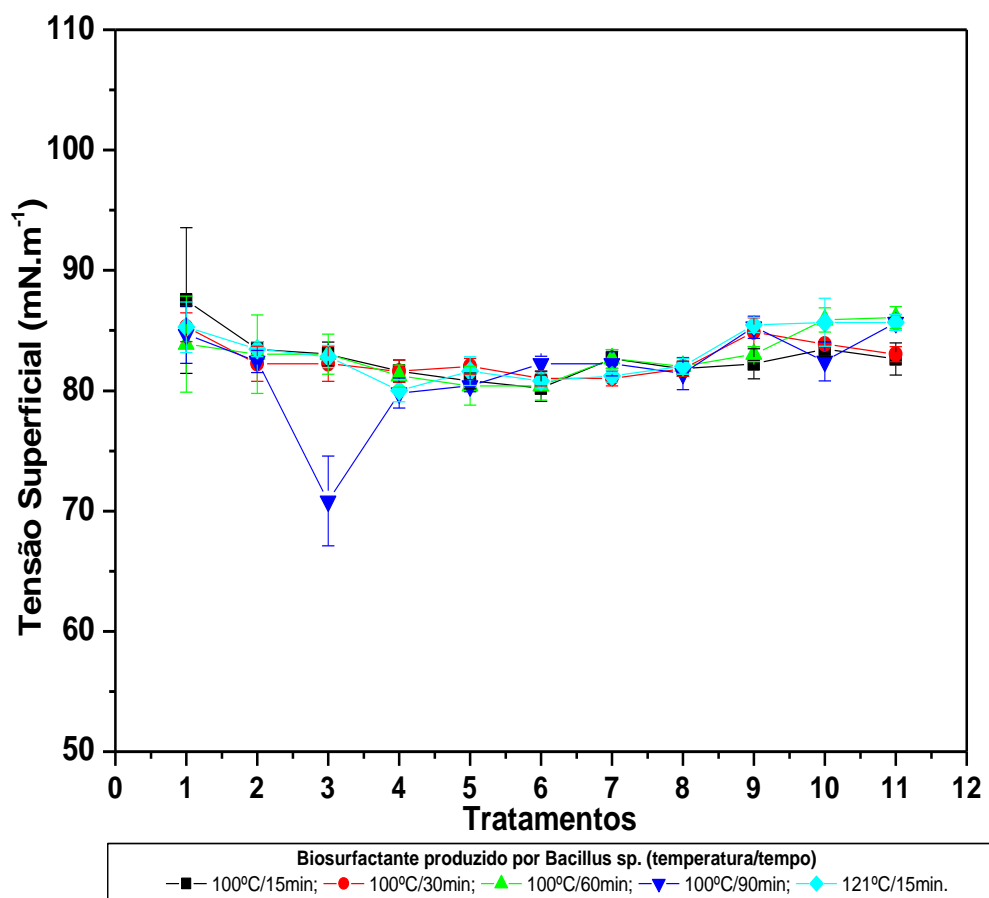
3.2. ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÃO DE POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH), TEMPERATURA E CLORETO DE SÓDIO (NACL)

Os biosurfactantes agem como tensoativos em solução, devido à presença do grupo lipofílico, ocupando preferencialmente a superfície do líquido, diminuindo assim a força de coesão entre as moléculas do solvente e, conseqüentemente, diminuindo a tensão superficial (BRITO; ALMEIDA,2011). Portanto, a estabilidade dos biosurfactantes produzidos pelos diferentes micro-organismos investigados em vários pHs, temperaturas e concentrações de NaCl tem como finalidade demonstrar a tenacidade desses biosurfactantes em meios hostis.

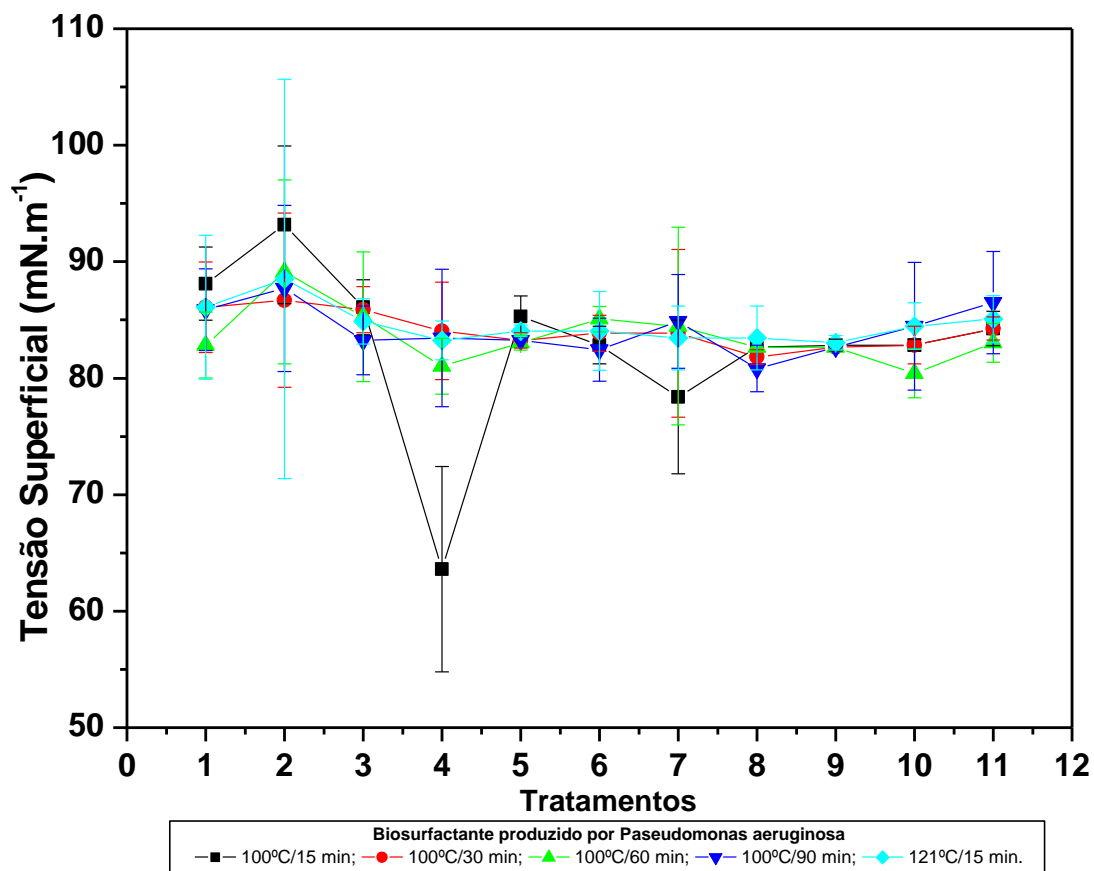
O biosurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) apresentaram estabilidade na tensão superficial em todas as concentrações de NaCl e temperatura, considerando as médias entre todos os tratamentos em que foram produzidos, enquanto o produzido por *P. aeruginosa* (UFPEDA 741) mostrou redução na tensão superficial no tratamento 4 a 100±1°C por 15 minutos (Figuras 2 e 3).



(A)

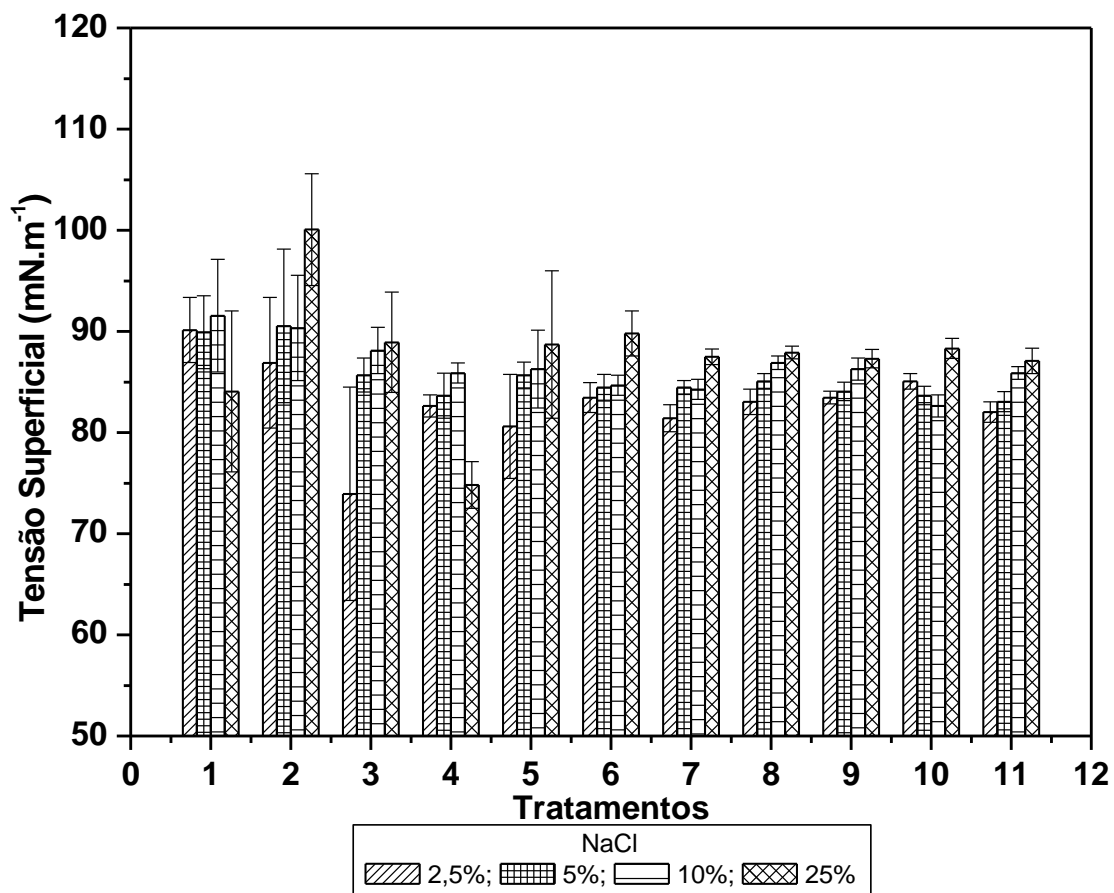


(B)

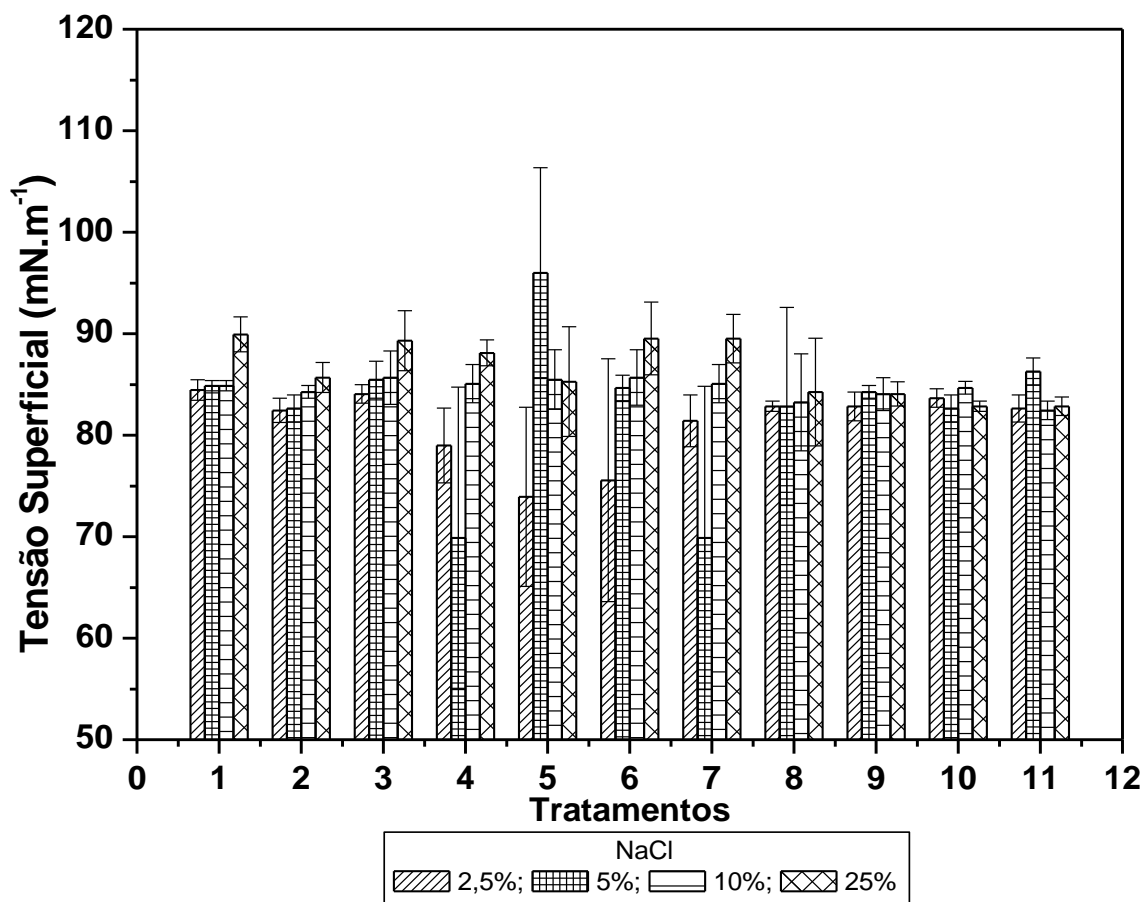


(C)

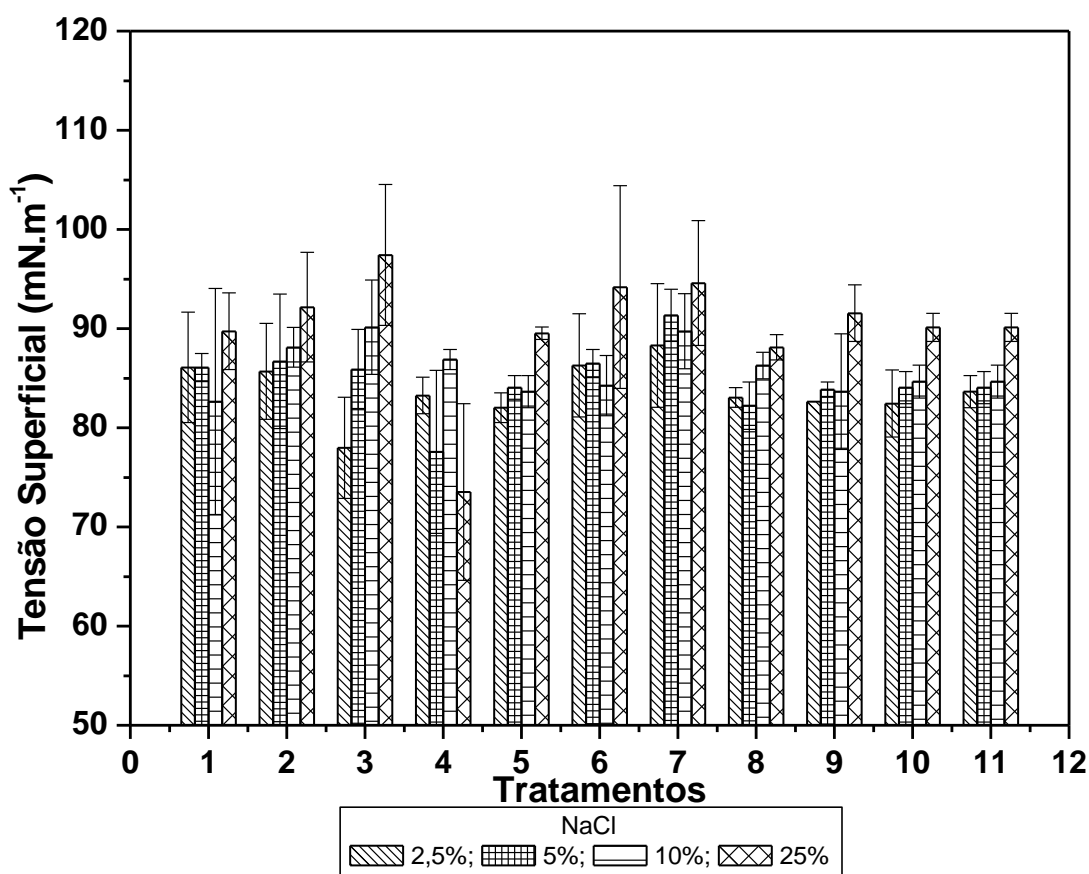
Figura 3 - Efeito da temperatura e do tempo na tensão superficial de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C).



(A)



(B)



(C)

Figura 4 - Efeito do NaCl na tensão superficial de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C).

Em um trabalho desenvolvido por Felix (2012) os efeitos da exposição à 100 °C em diferentes intervalos de tempo, sobre a tensão superficial do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (LAMI005), com exposição superiores a 1 hora, tiveram significativa diminuição da estabilidade, diferente do que foi verificado neste trabalho.

Dados encontrados por Sirtori (2006) acerca a estabilidade de biosurfactantes produzidos por *Bacillus sp.* mostrou estabilidade a todas as temperaturas testadas, mantendo aproximadamente 100% da sua atividade, com observado neste trabalho. Além disso, foi observado que no biosurfactante produzido *Pseudomonas aeruginosa* a tensão superficial diminuiu após exposição a altas temperaturas em autoclave,

121°C por 15 minutos. No entanto em trabalho desenvolvido por Rocha et al. (2007), por meio de análise estatística não houve diferença significativa entre os resultados obtidos, da mesma forma que o verificado neste trabalho.

Testes de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* frente à força iônica, foi observado estabilidade em todas as concentrações salinas pesquisadas de 2,5%, 5%, 10% e 20% (BARROS, 2007). Enquanto que em outra pesquisa os biosurfactantes produzidos por *Bacillus sp.* (LBBMA 111A) foram resistentes à presença de até 5% de NaCl, semelhantes aos resultados obtidos nesta pesquisa (LIMA, 2008). O biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cultivado em glicerol manteve a capacidade de redução da tensão superficial (27,5 mN/m) até a concentração de 10 % de NaCl (SILVA et al., 2009).

Os biosurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais. Dessa forma, a utilização dos surfactantes naturais se torna interessante em muitos produtos alimentícios industriais por suportar condições adversas pelo qual o alimento passa no processamento e conservação (BOGNOLO, 1999).

De modo geral, menores valores na tensão superficial do biosurfactante foi produzido pelo *Bacillus subtilis* quando analisados em todos os pHs. No entanto, o menor valor da tensão superficial, 75 mNm^{-1} , foi verificado no biosurfactante produzido pela *P. aeruginosa* em pH 11 (Figura 4).

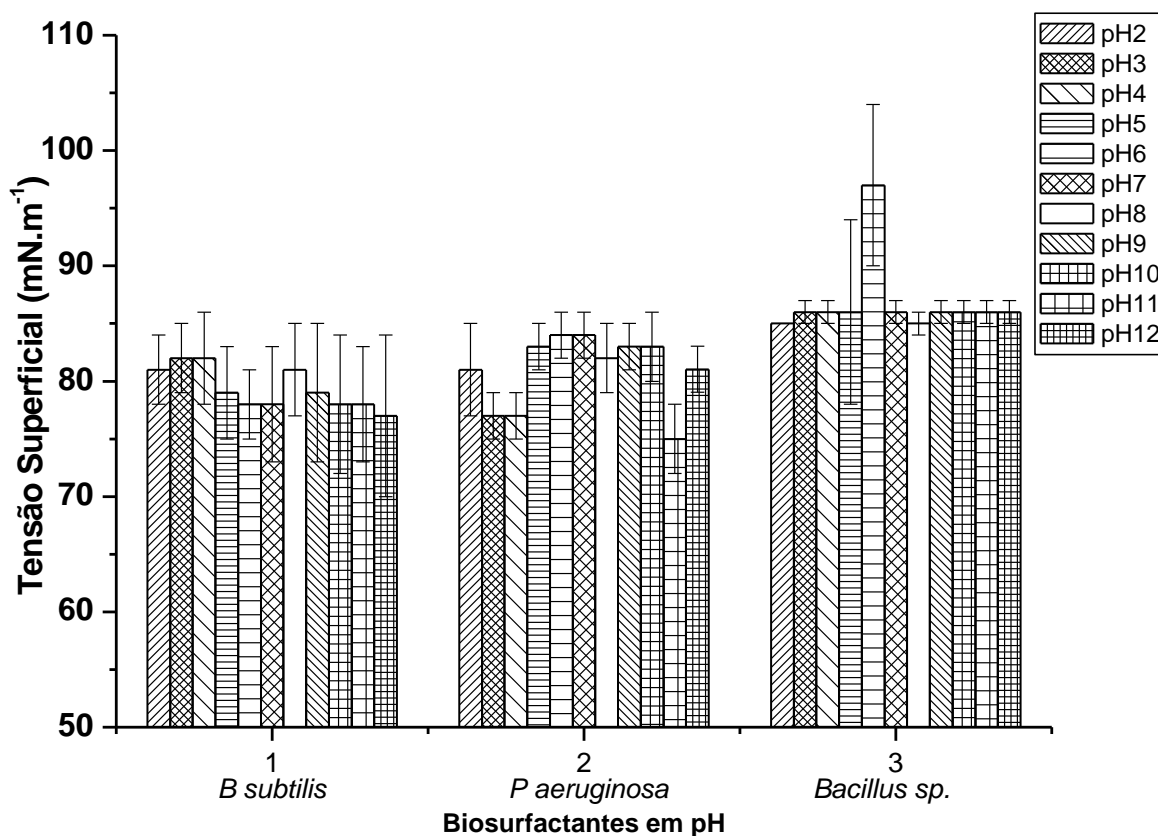


Figura 5 - Efeito do pH na tensão superficial de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86, *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741 e *Bacillus sp* (UFPEDA 436).

Outros trabalhos obtiveram surfactante produzido por *Bacillus subtilis* com estabilidade em pH entre 6 a 12 (COSTA, 2005), e em estudos com o líquido metabólico do biosurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* demonstraram a estabilidade na capacidade de reduzir a tensão superficial na faixa de pH entre 4 e 12, enquanto em pHs extremos de 2 e 14 foi observado uma redução da tensão superficial (LIMA, 2008).

3.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSURFACTANTES ANALISADAS EM PLACAS DE PETRI

Uma ampla gama de biosurfactantes demonstram atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos filamentosos, vírus e algas. Dentre eles o ramnolipídio e surfactina já foram relatados possuindo essa característica antimicrobiana (NITSCHKLE; COSTA, 2007)(DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008).

O biosurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) em todas as formas de tratamentos apresentou atividade antimicrobiana, ou seja, halo de inibição frente aos micro-organismos *Salmonella sp.*, *Escherichi coli* (ATCC 25922), *Bacillus sp.* (UFPEDA 191), *Staphylococcus aureus* (TSB 25923), *Bacillus cereus*(ATCC 33018), *Helicobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sp.* (UFPEDA 436), com exceção do biosurfactante produzido no tratamento 4. Este aspecto pode estar relacionado ao processo de produção do biosurfactante produzido por este micro-organismo, pois no meio de cultivo do tratamento 4 não foi adicionado LB e LB enriquecido com sais, ocasionando a redução na capacidade antimicrobiana. Foi verificado sensibilidade (halo de inibição ≥ 3 mm de diâmetro) do biosurfactante produzido pelo *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) na maioria dos tratamentos para todos os micro-organismos analisados (Quadro 1).

| Biosurfactante produzido por micro-organismos | Micro-organismos | Tratamentos /Atividade antimicrobiana | | | | | | | | | | |
|---|--|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
| <i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86) | <i>Salmonella sp.</i> | S | S | S | R | S | R | S | S | R | S | S |
| | <i>Escherichi coli</i> (ATCC 25922) | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | S |
| | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 191) | R | R | S | R | S | S | S | R | S | R | S |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> (TSB 25923) | S | R | S | R | S | S | S | R | R | S | S |
| | <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018) | S | R | S | R | S | S | S | S | R | S | R |
| | <i>Helicobacter sp.</i> | S | S | R | R | S | R | R | S | R | S | S |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R |
| | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 436) | S | S | R | R | S | S | R | R | R | S | R |
| <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 450) | <i>Salmonella sp.</i> | S | S | S | R | S | R | R | S | S | S | S |
| | <i>Escherichi coli</i> (ATCC 25922) | R | R | S | R | S | R | R | S | R | S | S |
| | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 191) | R | R | S | S | S | S | S | S | S | R | S |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> (TSB 25923) | R | S | S | R | S | S | R | S | S | S | S |
| | <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018) | S | S | S | R | S | R | S | R | R | R | S |
| | <i>Helicobacter sp.</i> | R | R | S | R | S | R | S | R | S | S | S |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | R | S | S | S | S | R | R | S | R | S | R |
| | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 436) | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R |

| Biosurfactante produzido por micro-organismos | Micro-organismos | Tratamentos /Atividade antimicrobiana | | | | | | | | | | |
|---|--|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) | <i>Salmonella sp.</i> | S | S | R | S | S | S | S | R | S | S | S |
| | <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | S | S | S | S | R | S | S | R | R | R | S |
| | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 191) | S | S | R | S | S | S | S | R | S | S | S |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> (TSB 25923) | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018) | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | <i>Helicobacter sp.</i> | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | S | S | S | S | R | R | R | R | R | R | S |
| | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 436) | S | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S |

Nota: Atividade antimicrobiana pela dimensão do halo de inibição (mm): S - sensível ≥ 3 mm; MS - moderadamente sensível > 2 mm e < 3 mm; R - resistente ≤ 2 mm.

Quadro 1 – Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de Difusão em Ágar

A atividade antimicrobiana do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* R14 foi observado em 29 cepas de bactérias (FERNANDES et al.,2007), demonstrando que a surfactina derivada de *Bacillus sp.* promoveu uma zona de inibição para alguns micro-organismos, entre eles a *Salmonella typhi* e a *Pseudomonas aeruginosa* CI 6, com maior e menor zona de inibição, respectivamente (FERNANDES et al.,2007)(JOE et al., 2012).

Em relação ao biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* foi verificado por Aquino (2009) em trabalho a existência atividade antimicrobiana em *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*.

Trabalho de comparações sugerem que a produção do biosurfactante pelo *Bacillus sp.* ocorre devido a mecanismos de proteção da célula em relação a outros micro-organismos (COLLA;COSTA;VIEIRA,2003) e a surfactina sendo considerada como um *cyclic lipopeptide biosurfactants* (CLPBS) possui diversas atividades biológicas, como antibacteriano, antiviral e a estimulação da atividade dos macrófagos (VOLLENBROICH,1997). Sendo assim, os ramnolipídios e a surfactina atuantes como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Pela excreção destes biosurfactantes no meio, os micro-organismos possuem maior oportunidade de sobrevivência e competitividade por nutrientes (NITSCHKE;PASTORE,2002).

3.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSURFACTANTES ANALISADAS EM TUBOS DE ENSAIO

Os biosurfactantes produzidos em todos os tratamentos pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) mostraram ação antimicrobiana sobre os micro-organismos analisados, quando foi observada a diminuição das leituras de densidade óptica, quando comparada às leituras realizadas nas soluções destes micro-organismos sem a presença do biosurfactante (Tabela 3), assim como verificado nas placas de Petri.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) em tubos de ensaios

| Micro-organismos | Tratamentos/ Absorbância em 620nm | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
| Controle | 0,430 | 0.480 | 0.348 | 0.310 | 0.500 | 0.500 | 0.280 | 0.220 | 0.500 | 0.480 | 0.280 |
| <i>B. cereus</i> (ATCC 33018) | 0.150 | 0.350 | 0.178 | 0.190 | 0.430 | 0.060 | 0.040 | 0.140 | 0.460 | 0.120 | 0.270 |
| <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 436) | 0.240 | 0.380 | 0.155 | 0.230 | 0.450 | 0.210 | 0.150 | 0.060 | 0.480 | 0.060 | 0.200 |
| <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 191) | 0.330 | 0.380 | 0.197 | 0.140 | 0.001 | 0.270 | 0.090 | 0.380 | 0.440 | 0.390 | 0.130 |
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | 0.230 | 0.300 | 0.067 | 0.070 | 0.001 | 0.420 | 0.220 | 0.050 | 0.350 | 0.370 | 0.040 |
| <i>Salmonella sp.</i> | 0.070 | 0.150 | 0.158 | 0.170 | 0.130 | 0.230 | 0.100 | 0.630 | 0.410 | 0.030 | 0.120 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0.120 | 0.070 | 0.227 | 0.010 | 0.020 | 0.140 | 0.020 | 0.130 | 0.410 | 0.160 | 0.070 |
| <i>Helicobacter sp.</i> | 0.380 | 0.060 | 0.017 | 0.130 | 0.040 | 0.370 | 0.010 | 0.120 | 0.480 | 0.020 | 0.010 |
| <i>S. aureus</i> | 0.185 | 0.430 | 0.044 | 0.189 | 0.100 | 0.246 | 0.079 | 0.988 | 0.033 | 0.053 | 0.007 |

Nota – Controle: biosurfactante sem micro-organismos.

O biosurfactante produzido pelo *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) nos tratamentos 1 e 5 apresentaram maior efeito antimicrobiano entre os micro-organismos analisados, tendo maior eficiência sobre o *Bacillus sp.* (UFPEDA 436), comparado ao controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana de biosurfactante produzido por *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) em tubos de ensaio.

| Micro-organismos | Tratamentos/ Absorbância em 620nm | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
| Controle | 1.021 | 0.442 | 0.744 | 0.185 | 0.407 | 0.220 | 0.091 | 0.138 | 0.126 | 0.332 | 0.215 |
| <i>B. cereus</i> (ATCC 33018) | 0.172 | 0.534 | 0.856 | 0.701 | 0.230 | 0.807 | 0.255 | 0.280 | 0.289 | 0.924 | 0.952 |
| <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 436) | 0.238 | 0.285 | 0.735 | 0.332 | 0.169 | 0.344 | 0.307 | 0.298 | 0.356 | 0.465 | 0.377 |
| <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 191) | 0.623 | 0.276 | 0.666 | 0.304 | 0.206 | 0.118 | 0.450 | 0.122 | 0.144 | 0.286 | 0.334 |
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | 0.286 | 0.491 | 1.103 | 0.381 | 0.331 | 0.555 | 0.291 | 0.406 | 0.401 | 0.674 | 0.456 |
| <i>Salmonella sp.</i> | 0.348 | 1.179 | 1.428 | 0.448 | 0.293 | 0.275 | 0.387 | 0.414 | 0.835 | 0.538 | 0.442 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0.152 | 0.929 | 0.818 | 0.251 | 0.517 | 0.196 | 0.384 | 0.353 | 0.135 | 0.303 | 0.288 |
| <i>Helicobacter sp.</i> | 0.594 | 0.356 | 1,484 | 0.707 | 0.344 | 0.541 | 0.276 | 0.696 | 0.516 | 0.527 | 0.401 |
| <i>S. aureus</i> | 0.579 | 0.716 | 0.836 | 0.450 | 0.696 | 0.350 | 0.303 | 0.356 | 0.206 | 0.344 | 0.192 |

Nota – Controle: biosurfactante sem micro-organismos.

O biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) nos tratamentos 1, 2, 3 e 6 mostraram efeito inibidor para todos os micro-organismos analisados, comparado ao controle (Tabela 5). Esse efeito antimicrobiano sugere que o meio de cultivo, com maior concentração de nutrientes, possa interferir nesta característica do biosurfactante. Meio de cultivo produzido somente com bagaço de cana (tratamento 4) foi capaz de proporcionar uma produção de biosurfactante com efeito inibitório ao crescimento da maioria dos micro-organismos investigados, com exceção do *Bacillus sp.* (UFPEDA 191) e da *E. coli*. De modo geral, o bagaço da cana de açúcar com o meio de cultivo Luria Bertani mostraram influência direta sobre a produção e características inibitórias do biosurfactante produzido.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em tubos de ensaio.

| Micro-organismos | Tratamentos/ Absorbância em 620nm | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 |
| Controle | 0.500 | 0.400 | 0.100 | 0.100 | 0.100 | 0.600 | 0.100 | 0.240 | 0.480 | 0.480 | 0.300 |
| <i>B. cereus</i> (ATCC 33018) | 0.172 | 0.220 | 0.040 | 0.007 | 0.114 | 0.262 | 0.400 | 0.408 | 0.435 | 0.402 | 0.585 |
| <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 436) | 0.064 | 0.49 | 0.035 | 0.045 | 0.010 | 0.276 | 0.411 | 0.300 | 0.431 | 0.407 | 0.406 |
| <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 191) | 0.300 | 0.176 | 0.061 | 0.400 | 0.039 | 0.137 | 0.518 | 0.458 | 0.142 | 0.290 | 0.188 |
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | 0.136 | 0.425 | 0.043 | 0.550 | 0.010 | 0.012 | 0.307 | 0.453 | 0.355 | 0.222 | 0.156 |
| <i>Salmonella sp.</i> | 0.266 | 0.533 | 0.050 | 0.084 | 0.126 | 0.058 | 0.387 | 0.436 | 0.500 | 0.504 | 0.712 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 0.070 | 0.266 | 0.063 | 0.084 | 0.005 | 0.089 | 0.334 | 0.271 | 0.264 | 0.201 | 0.300 |
| <i>Helicobacter sp.</i> | 0.223 | 0.448 | 0.006 | 0.009 | 0.181 | 0.024 | 0.303 | 0.241 | 0.570 | 0.427 | 0.384 |
| <i>S. aureus</i> | 0.055 | 0.026 | 0.062 | 0.055 | 0.042 | 0.050 | 0.331 | 0.375 | 0.288 | 0.206 | 0.148 |

Nota – Controle: biosurfactante sem micro-organismos.

3.5. PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE

A produção de biosurfactante apresentou maior concentração nos tratamentos com maior fonte de carbono, ou seja, tratamento 1 produzido pelo *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e tratamento 9 pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741). Concentração menor de biosurfactante foi verificada no tratamento 8, por todos os micro-organismos analisados, pois não foi adicionado fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais, contendo nutrientes no fermentado apenas os oriundos do processo de inoculação (Tabela 6). Este aspecto reforça a relação positiva da alta concentração de fonte de carbono e outras fontes limitantes de nutrientes para produção de biosurfactante (COLLA; COSTA; VIEIRA, 2003).

Tabela 6 – Concentração de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) em processo fermentativo sob agitação.

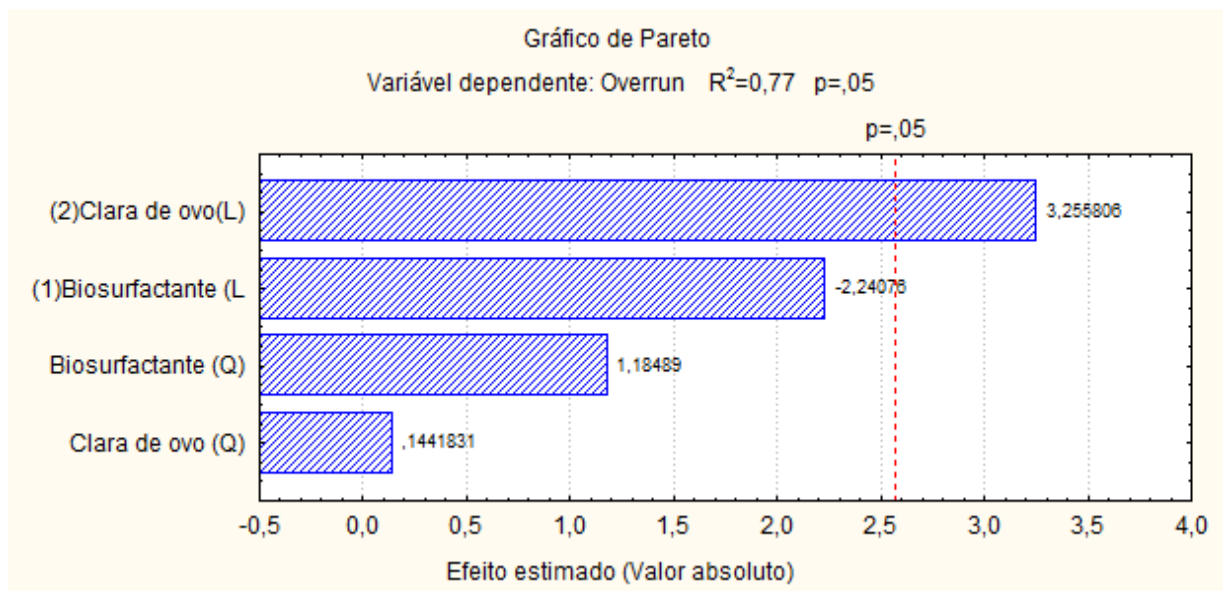
| Tratamentos | Biosurfactante (g. L ⁻¹) (b.s.) | | |
|-------------|---|-------------------------------------|---|
| | <i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86) | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 450) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 741) |
| 1 | 0.10 | 2.85 | 1.22 |
| 2 | 0.05 | 1.84 | 0.91 |
| 3 | 0.08 | 1.64 | 1.31 |
| 4 | 0.03 | 0.31 | 0.49 |
| 5 | 0.11 | 2.51 | 0.25 |
| 6 | 0.22 | 0.59 | 0.48 |
| 7 | 0.08 | 0.20 | 0.28 |
| 8 | 0.01 | 0.02 | 0.04 |
| 9 | 0.37 | 2.06 | 2.15 |
| 10 | 0.230 | 2.225 | 1.505 |
| 11 | 0.180 | 1.845 | 1.585 |

Segundo a análise de variância ANOVA no seu modelo quadrático, o bagaço da cana de açúcar teve efeito significativo ($p \geq 0,05$), porém negativo, sobre a produção de biosurfactante pelos micro-organismos *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741).

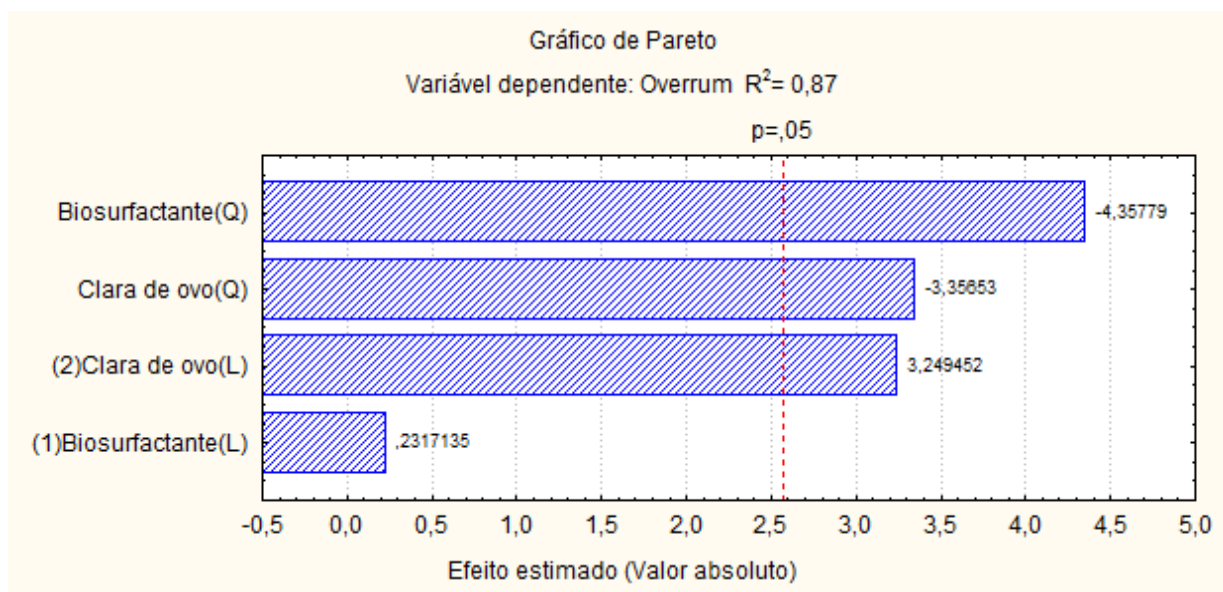
3.6. EMULSÃO DE CLARA DE OVO ADICIONADO DE BIOSURFACTANTE. VOLUME DA ESPUMA

O gráfico de Pareto mostra que todos os efeitos que ultrapassam a linha no valor de $p \leq 0,05$ são significativos, desse modo foi observado que a clara de ovo do modelo linear teve influencia direta no volume da espuma da emulsão de clara de ovo com biosurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), com efeito positivo estimado em 3,25. O biosurfactante produzido pelo *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e a clara de ovo do modelo quadrático apresentou influência negativa e a clara de ovo do modelo linear com influência direta, na manutenção do volume da espuma. Não houve influência significativa ($p \geq 0,05$) no volume da espuma pelo

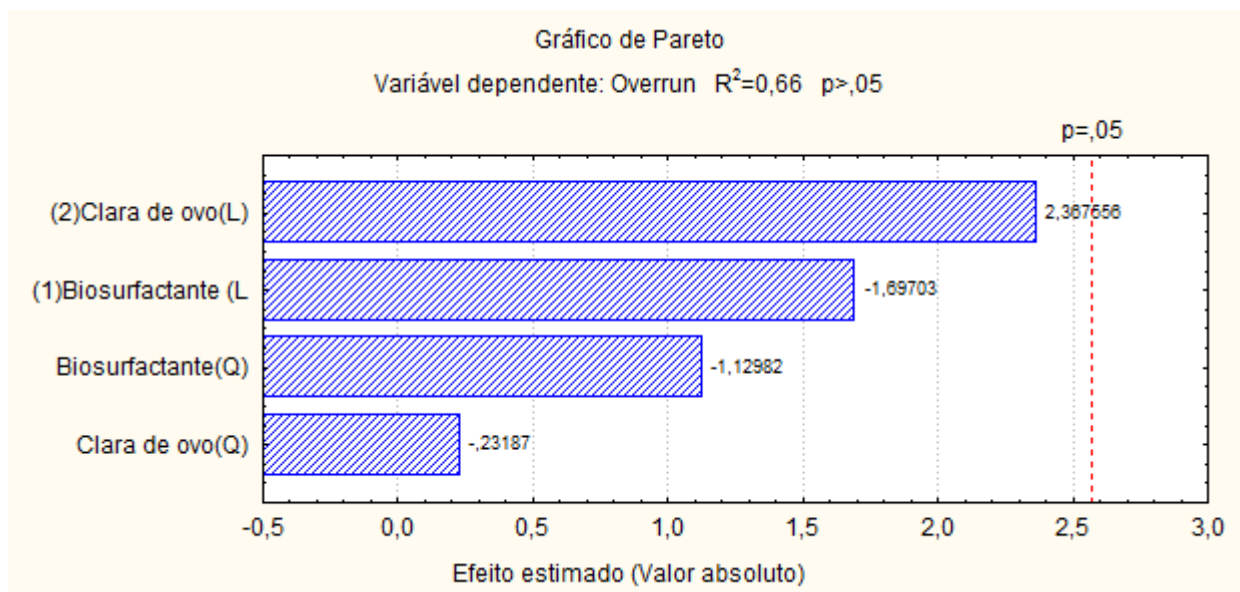
biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* e da clara de ovo (Figura 5).



(A)



(B)



(C)

Figura 6 – Gráfico de Pareto: efeito do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C) e da clara de ovo sobre o volume da espuma.

Os biosurfactantes auxiliam indiretamente na aeração da emulsão, pelo aumento da saturação da superfície do líquido, reduzindo a tensão superficial e facilitando as proteínas, presentes na emulsão, a envolverem as moléculas de ar (SANTOS, 2008)

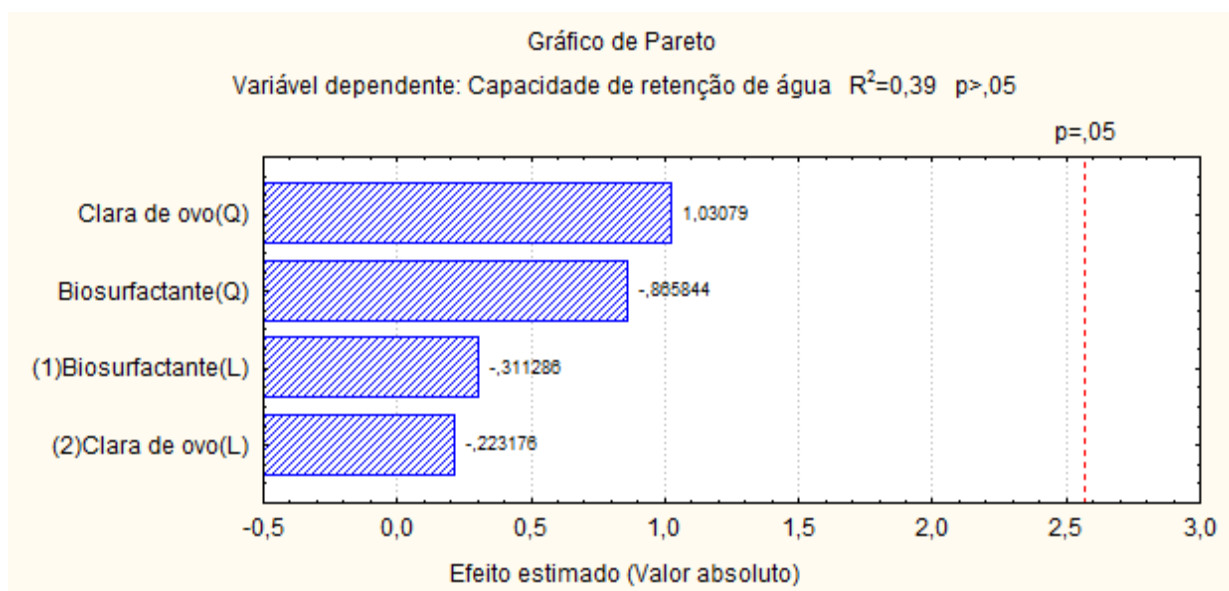
Em trabalho desenvolvido por Almeida et al. (2011) foi observado que a concentração de biosurfactante produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* teve influencia direta no volume da espuma da emulsão de clara de ovo, o que não foi verificado neste trabalho.

3.7. ESTABILIDADE DA EMULSÃO - CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA

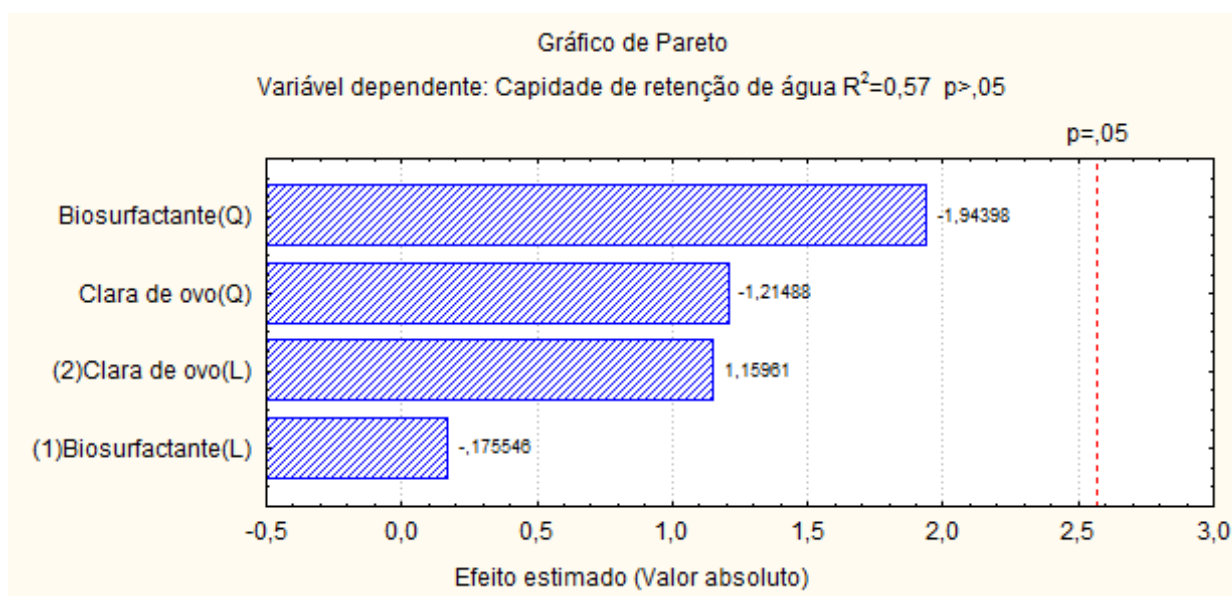
O termo “estabilidade da emulsão” pode ser empregado em relação a três fenômenos essencialmente diferentes – sedimentação, floculação e quebra da emulsão por causa da coalescência das gotículas dispersas. A sedimentação resulta da diferença de densidade das duas fases e a floculação das colisões das partículas, que por sua vez podem levar à coalescência e à formação de glóbulos maiores (SHAW, 1970). Baixos valores de pH também alteram as forças

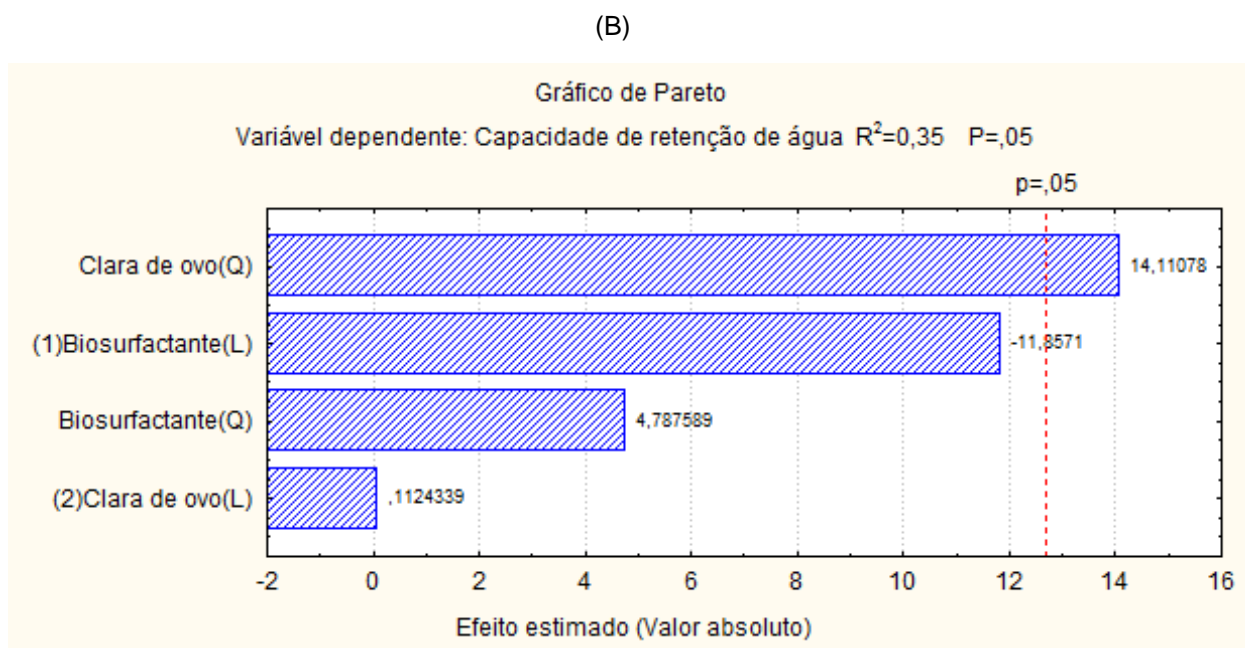
eletrostáticas envolvidas na formação das emulsões, o que promove floculação seguida da sedimentação dos flocos, acarretando em instabilidade (ANTUNES, 2007).

No que se refere a capacidade de retenção de água da emulsão, os resultados do biosurfactante produzido pelos *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) não foram significativas sobre as variáveis independentes analisadas. Entretanto, a clara de ovo do modelo quadrático teve efeitos positivos sobre a capacidade de retenção de água em emulsões de clara de ovo com biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (Figura 6).



(A)



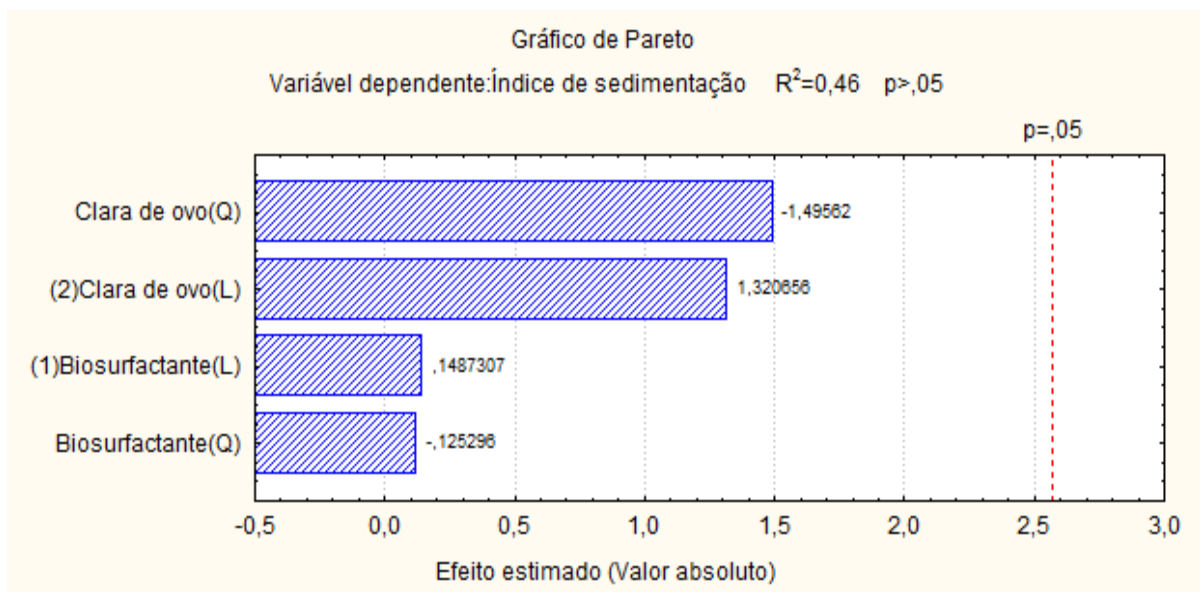


(C)

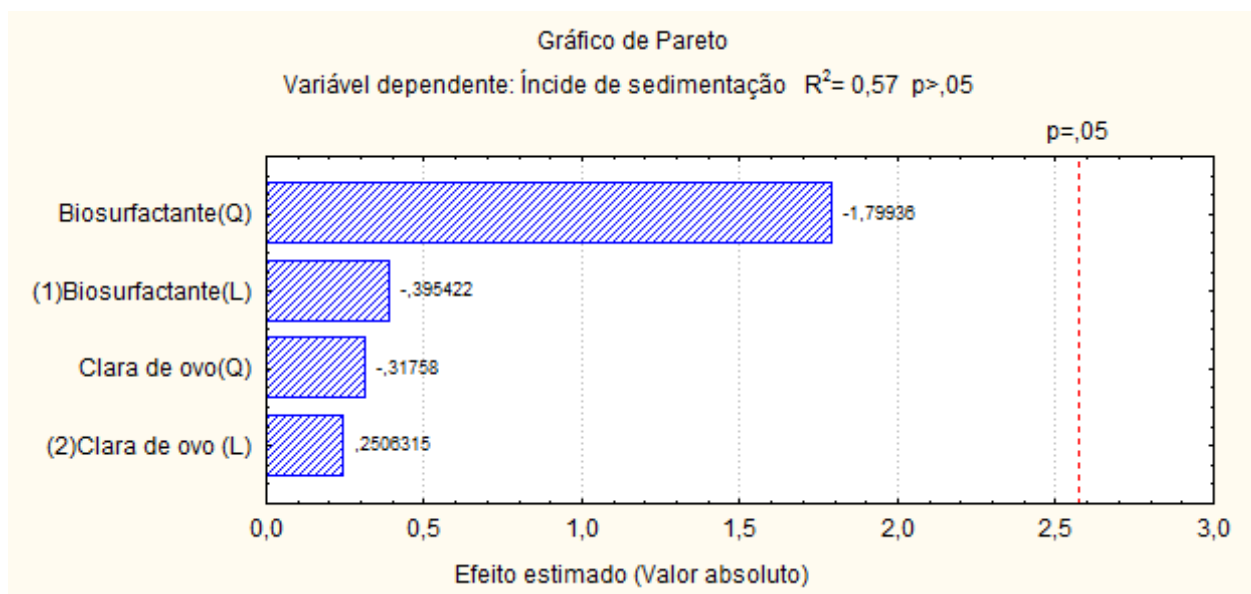
Figura 7 – Gráfico de Pareto: efeito do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C) e da clara de ovo sobre a capacidade de retenção de água.

3. 8. ESTABILIDADE DA EMULSÃO - ÍNDICE DE SEDIMENTAÇÃO

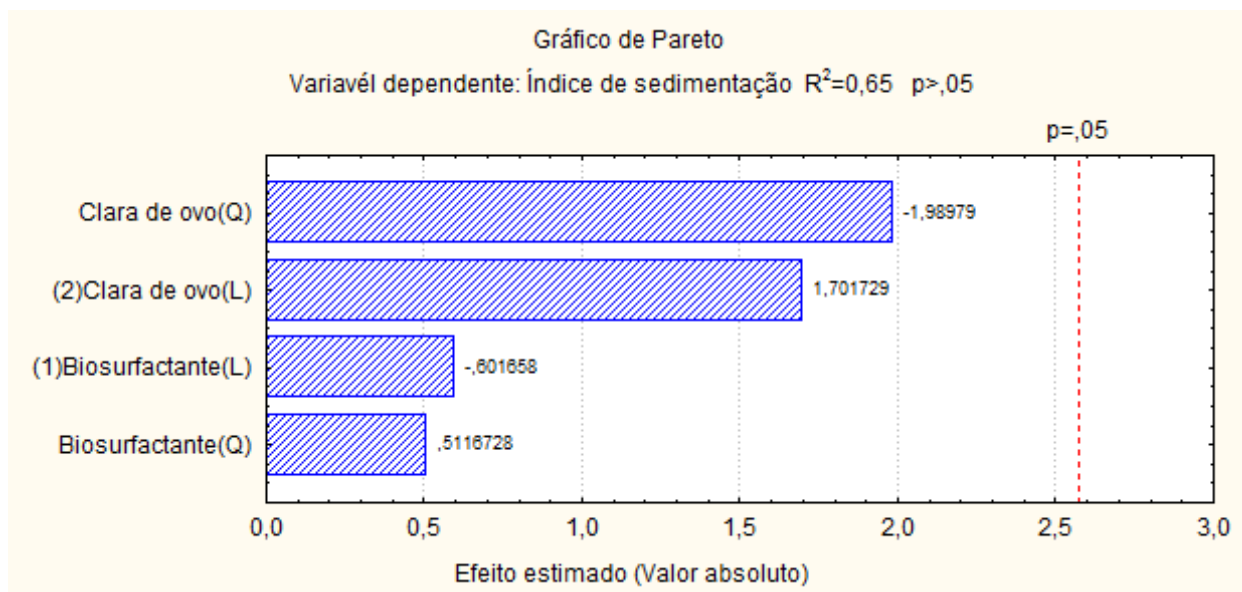
Segundo os gráficos de Pareto não houve significância estatística ($p \geq 0,05$) para o índice de sedimentação na emulsão da clara de ovo com os biosurfactantes produzidos pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (Figura 7).



(A)



(B)

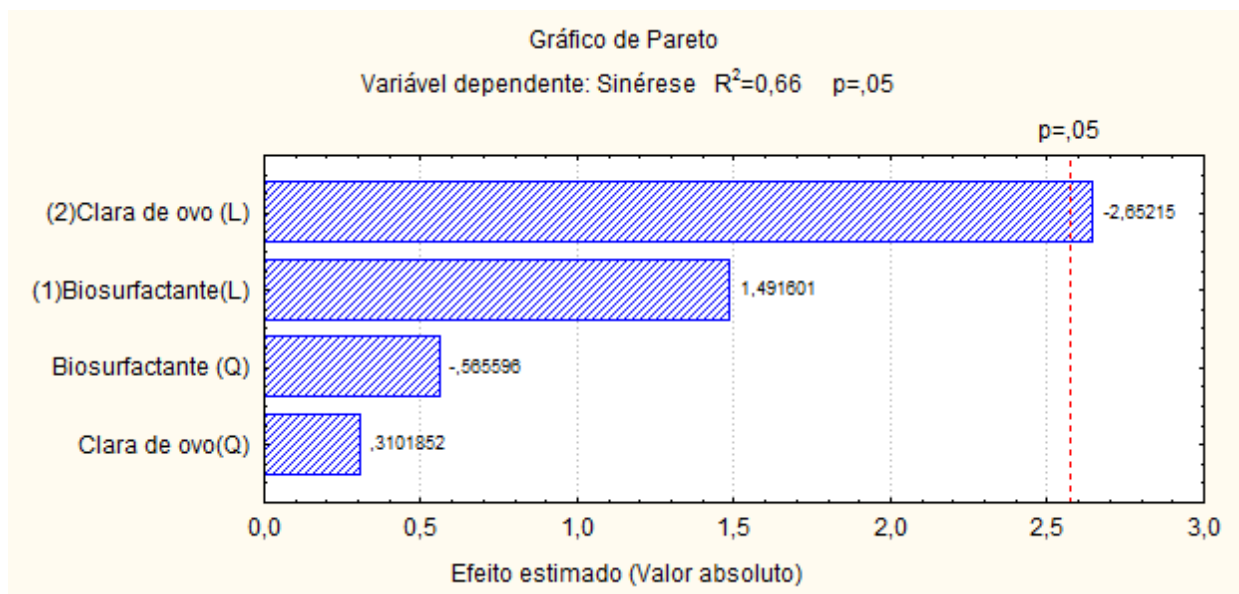


(C)

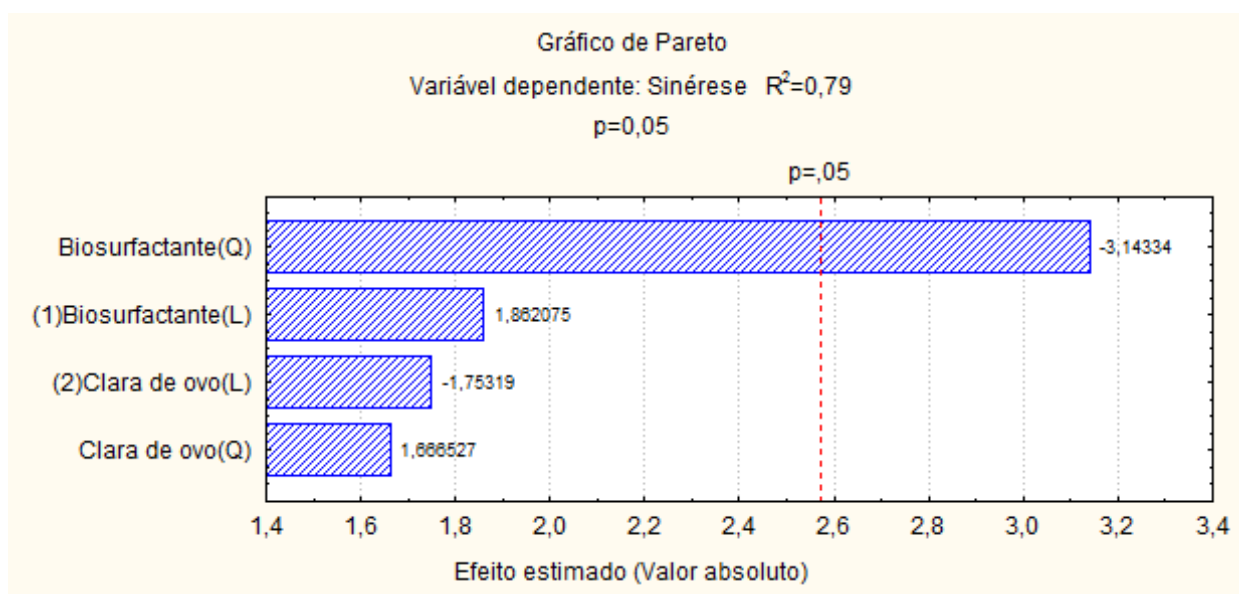
Figura 8 – Gráfico de Pareto: efeito do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C) e da clara de ovo sobre o índice de sedimentação.

3.9. SINÉRESE

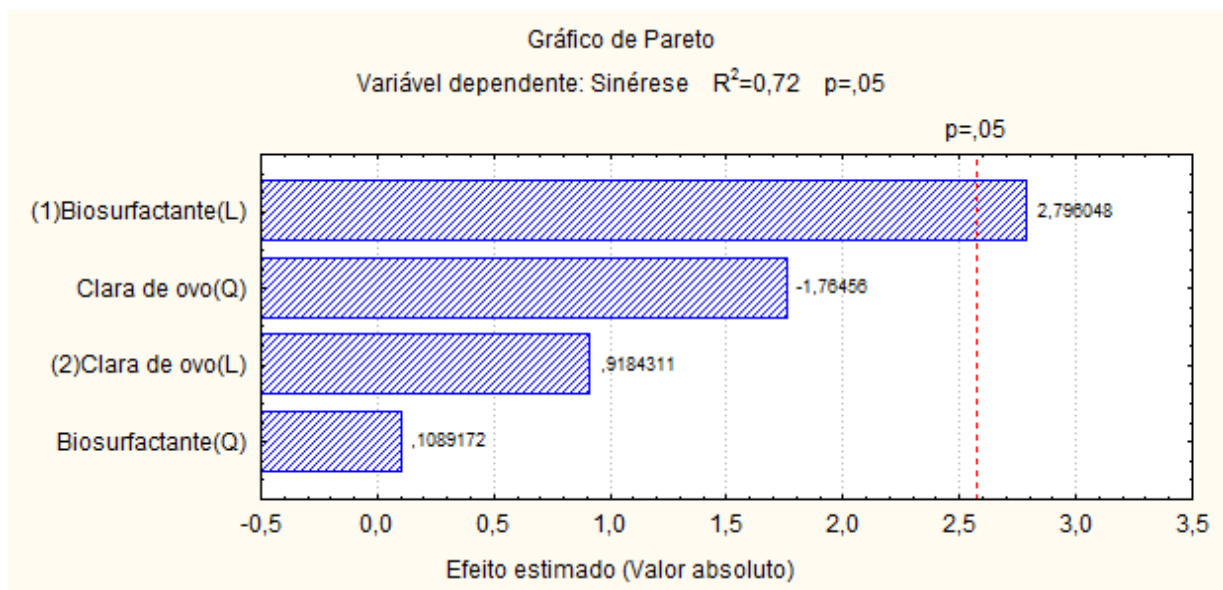
Segundo os gráficos de Pareto houve significância estatística ($p \leq 0,05$) nos resultados da sinérese na emulsão da clara de ovo com os biosurfactantes produzidos pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741). A clara de ovo, no modelo linear, e o biosurfactante, no modelo quadrático, mostraram efeito inversamente proporcional sobre a sinérese da emulsão da clara de ovo com biosurfactante, produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) respectivamente, ou seja, quanto maior a concentração destas variáveis menor será a sinérese. No entanto, o biosurfactante no modelo linear produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) teve efeito positivo sobre a sinérese na emulsão (Figura 8).



(A)



(B)



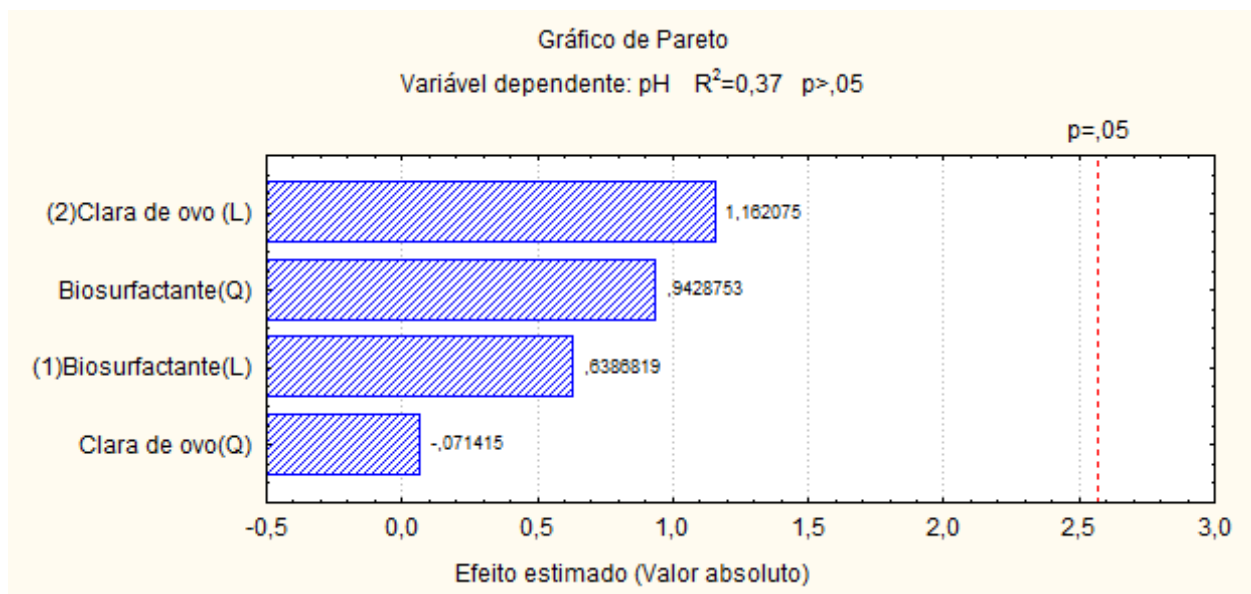
(C)

Figura 9 – Gráfico de Pareto: efeito do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C) e da clara de ovo sobre a sinérese.

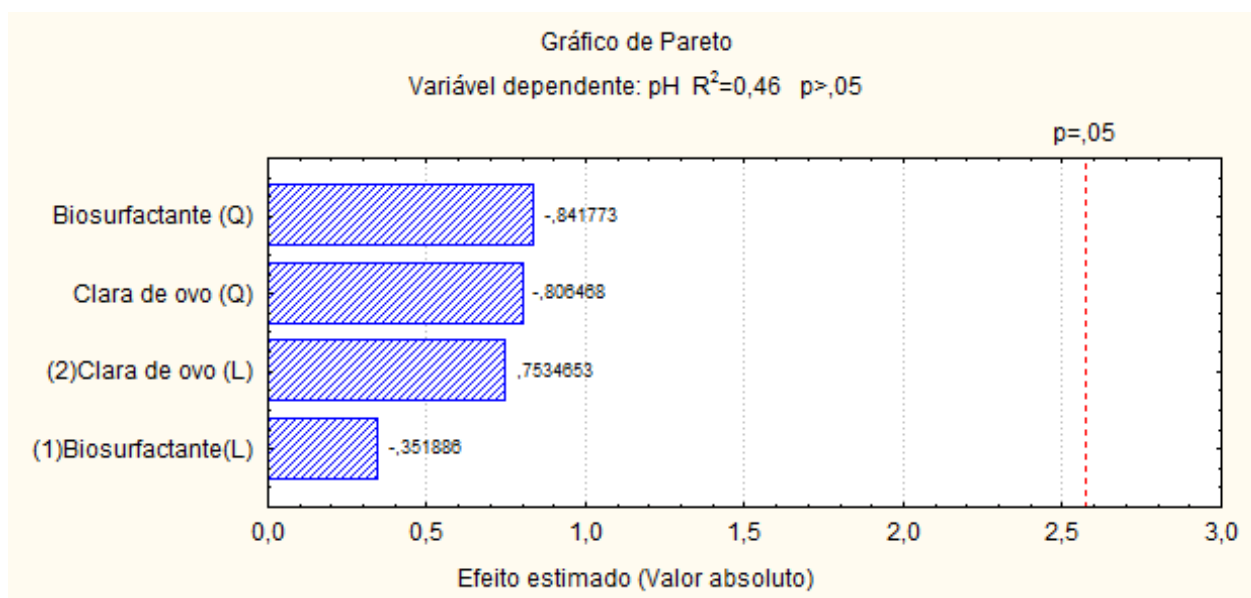
A sinérese define uma forma de instabilidade de géis aquosos e não-aquosos. Esta instabilidade que forma a separação da fase solvente ocorre devido à contração elástica das moléculas poliméricas no processo de inchamento, onde as macromoléculas envolvidas tornam-se distendidas e as forças elásticas aumentam com o inchamento (FLORENCE;ATTWOOD,2003). Portanto, o biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) mostrou melhor efeito para manter a estabilidade quanto a sinérese da emulsão da clara de ovo.

3.10. POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

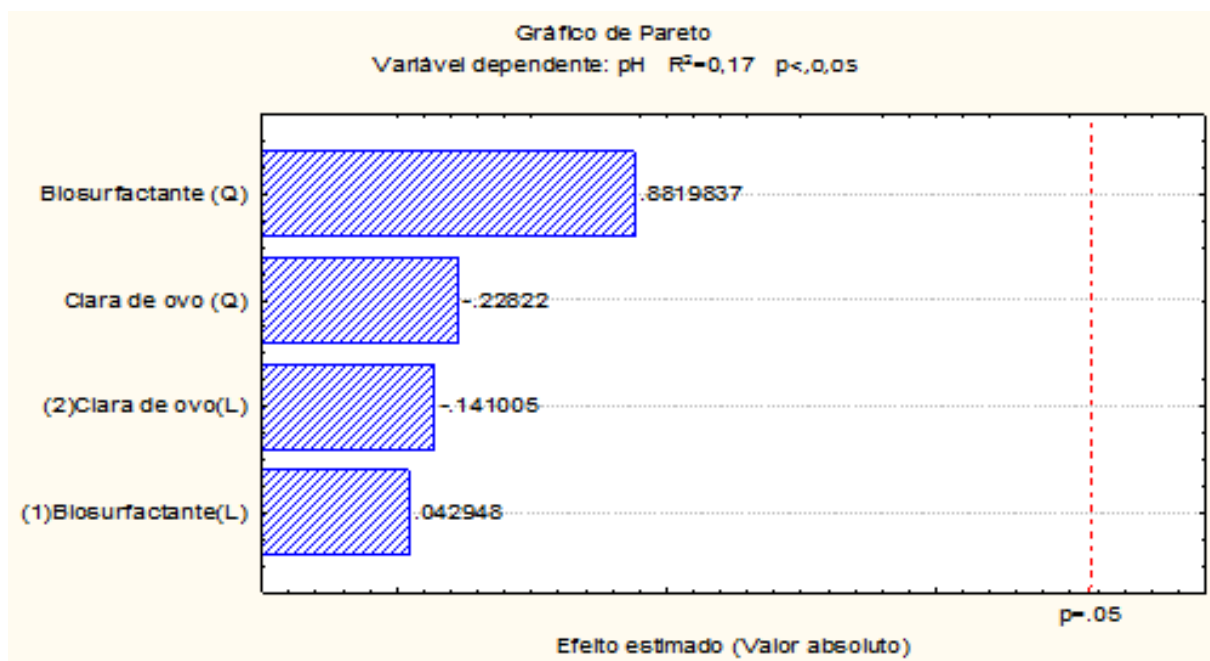
Segundo os gráficos de Pareto não houve significância estatística ($p \geq 0,05$) para o potencial hidrogeniônico na emulsão da clara de ovo com os biosurfactantes produzidos pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (Figura 9).



(A)



(B)



(C)

Figura 10 – Gráfico de Pareto: efeito do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C) e da clara de ovo sobre o potencial hidrogeniônico.

O pH da clara do ovo está em torno de 7,9 e os valores médios encontrados entre os tratamentos dos biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) foi de 8,0. Desse modo, houve dificuldade na estabilização da espuma, devido a valores de pH acima de 5,0, confirmando os resultados verificados em outra pesquisa (GUASER et al., 2007). O trabalho de comparação desenvolvido por Chaves-Montes, Choplin e Schaer (2007) demonstra que emulsões contendo albumina em concentrações de 1%, pH 5 e uso de hidrocoloídes, tem como efeito o aumento da estabilidade da espuma.

3.11. COR DA EMULSÃO DE CLARA DE OVO COM BIOSURFACTANTE

Os valores de L* indicam a luminosidade na faixa de 100 (branco) a 0 (preto), que o diferencia em claro e escuro. Portanto, considerando a média das luminosidades entre os tratamentos, as maiores luminosidades foram observadas nas emulsões de clara de ovo com biosurfactantes produzidos em ordem decrescente, por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (64,9), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (63,4) e *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (60,0) (Tabela 7). Portanto, os

biosurfactantes produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) mostraram menor interferência no escurecimento da emulsão da clara de ovo.

Tabela 7 – Coloração da emulsão de clara de ovo com biosurfactante

| Tratamentos | <i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86) | | | <i>Bacillus sp.</i> (UFPEDA 450) | | | <i>P. aeruginosa</i> (UFPEDA 741) | | |
|-------------|---|-------|-------|-------------------------------------|-------|------|--------------------------------------|-------|------|
| | L | a* | b* | L | a* | b* | L | a* | b* |
| 1 | 42.04 | -0.01 | 3.63 | 63.70 | 0.12 | 6.56 | 64.40 | -0.19 | 6.41 |
| 2 | 62.12 | -0.34 | 2.44 | 64.13 | -0.67 | 4.40 | 66.18 | -0.70 | 4.19 |
| 3 | 61.76 | 0.51 | 9.63 | 64.39 | -0.42 | 8.18 | 66.67 | -0.08 | 8.69 |
| 4 | 55.77 | -0.23 | 5.00 | 64.38 | -0.33 | 4.75 | 63.10 | 0.12 | 8.24 |
| 5 | 63.65 | -0.03 | 4.54 | 65.71 | -0.49 | 5.87 | 64.44 | -0.15 | 4.37 |
| 6 | 66.17 | -0.15 | 2.71 | 67.12 | 0.50 | 3.44 | 65.48 | -0.63 | 5.94 |
| 7 | 57.83 | 1.33 | 12.52 | 63.08 | -0.39 | 6.62 | 63.70 | 0.31 | 9.53 |
| 8 | 63.76 | -0.19 | 4.00 | 66.69 | -0.59 | 3.05 | 63.10 | -0.41 | 2.60 |
| 9 | 63.90 | 0.42 | 6.20 | 51.34 | -0.26 | 3.67 | 66.39 | -0.34 | 3.65 |
| 10 | 63.49 | 0.79 | 7.90 | 63.26 | -0.44 | 3.24 | 65.53 | -0.48 | 4.71 |

Nota – Luminosidade (L) faixa de 100 (branco) a 0 (preto), croma a* faixa do verde (- 60) ao vermelho (+ 60) e croma b* faixa do azul (- 60) ao amarelo (+ 60)

O croma a* está relacionada à intensidade de cores, com variação do verde (- 60) ao vermelho (+ 60). Considerando os valores do croma a* foi verificado uma variação de -0,23 a 1,33, -0,67 a 0,50 e -0,70 a 0,31 para o biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741). Respectivamente, percebe-se uma coloração voltada com maior intensidade para o verde, pela maioria dos valores negativos apresentados. O croma b* apresenta variação das cores do azul (- 60) a amarelo (+ 60) e mostrou resultados positivos, ou seja, indicando uma coloração levemente amarelada em todos os tratamentos (Tabela 7).

3.12. VISCOSIDADE DA EMULSÃO

A avaliação da viscosidade ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez apropriada e pode indicar se a estabilidade é adequada, ou seja, fornece indicação do comportamento do produto ao longo do tempo (BRASIL,2007). As instabilidades provenientes da variação no tamanho e no número

de partículas e na orientação ou migração do emulsionante durante um período de tempo podem ser detectadas por meio de alterações na viscosidade aparente do produto (LOGARAJ et al., 2008).

Os tratamentos apresentaram características de um fluido não newtoniano tixotrópico, característico de emulsões e soluções protéicas. A tixotropia ocorre quando um fluido é submetido a uma variação da taxa de deformação e há presença de uma histerese, ou seja, a viscosidade do sistema sujeita a uma tensão de cisalhamento por um tempo não é a mesma (SKELLAND, 1967). Todas as claras de ovo com adição de biosurfactante apresentam menor viscosidade em relação ao tratamento controle. No entanto, o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* mostrou maior viscosidade comparando ao dos outros micro-organismos (Figura 10).

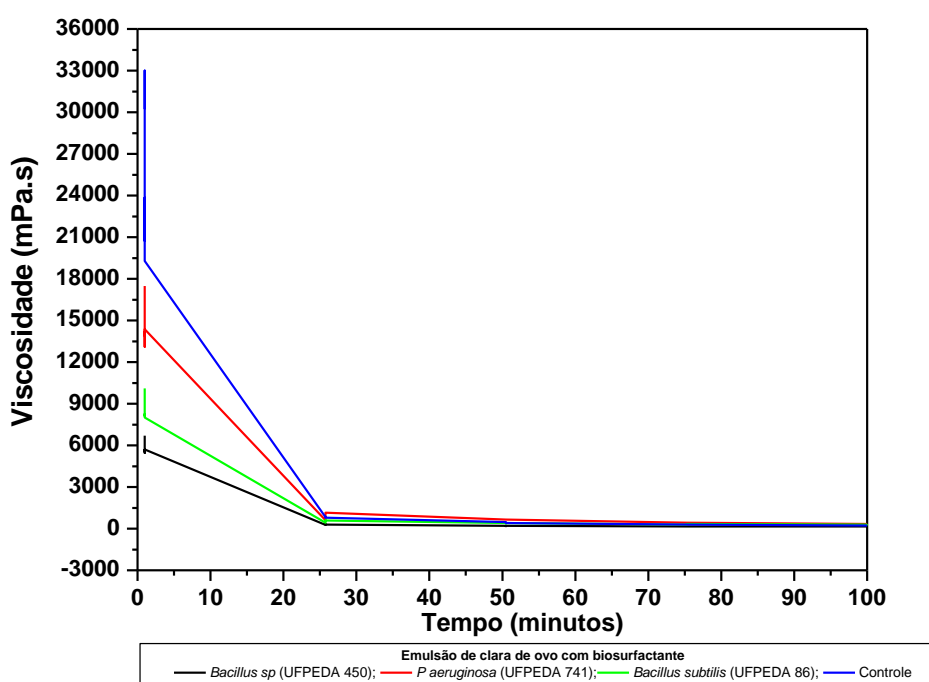
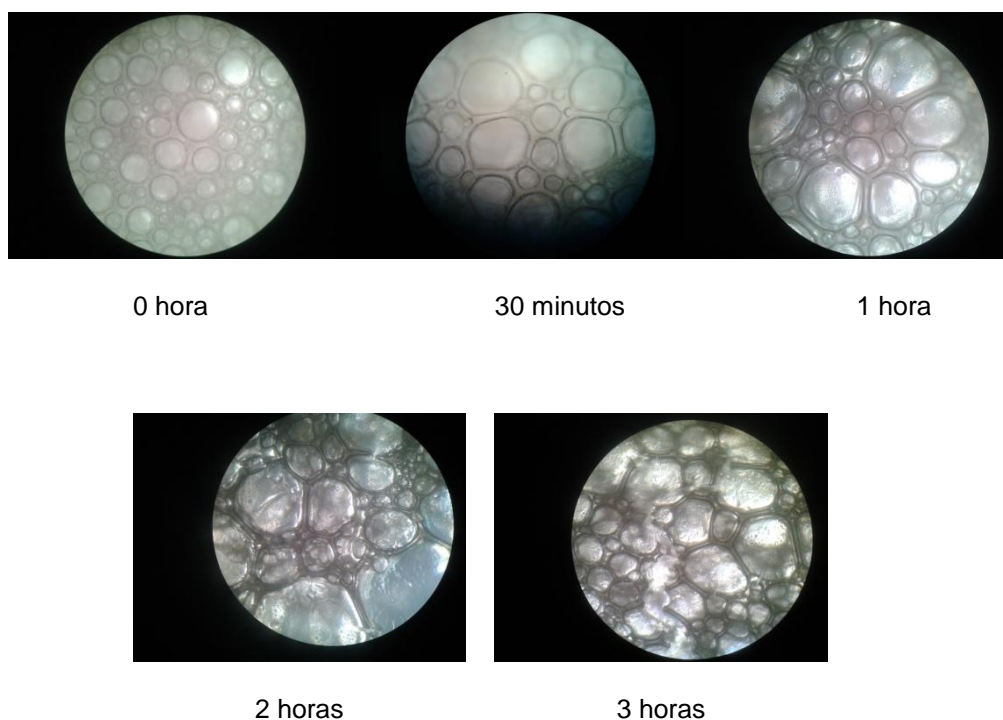


Figura 11: Gráfico de propriedade reológicas dos biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) e tratamento controle.

3.13. MICROSCOPIA ÓTICA DA EMULSÃO

A estabilidade de uma emulsão depende essencialmente de três fatores, como sedimentação, floculação e a quebra da emulsão devido à coalescência das

gotículas dispersas (IZQUIERDO et al., 2002). Por meio das imagens foi observada a influência desses fatores na estabilidade da clara de ovo pelo emulsificante, com maior desestabilização a partir de 2 horas (Figura 11).

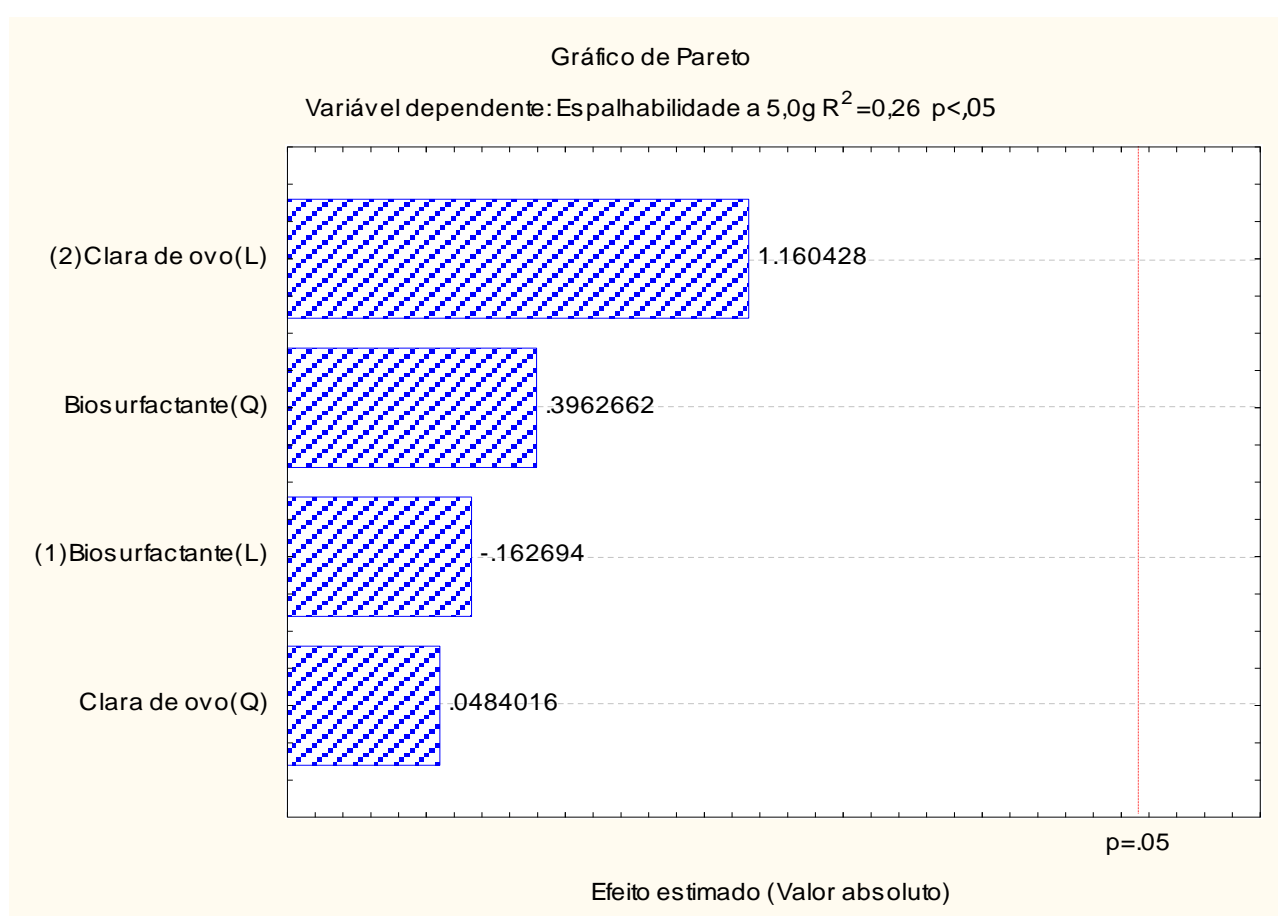


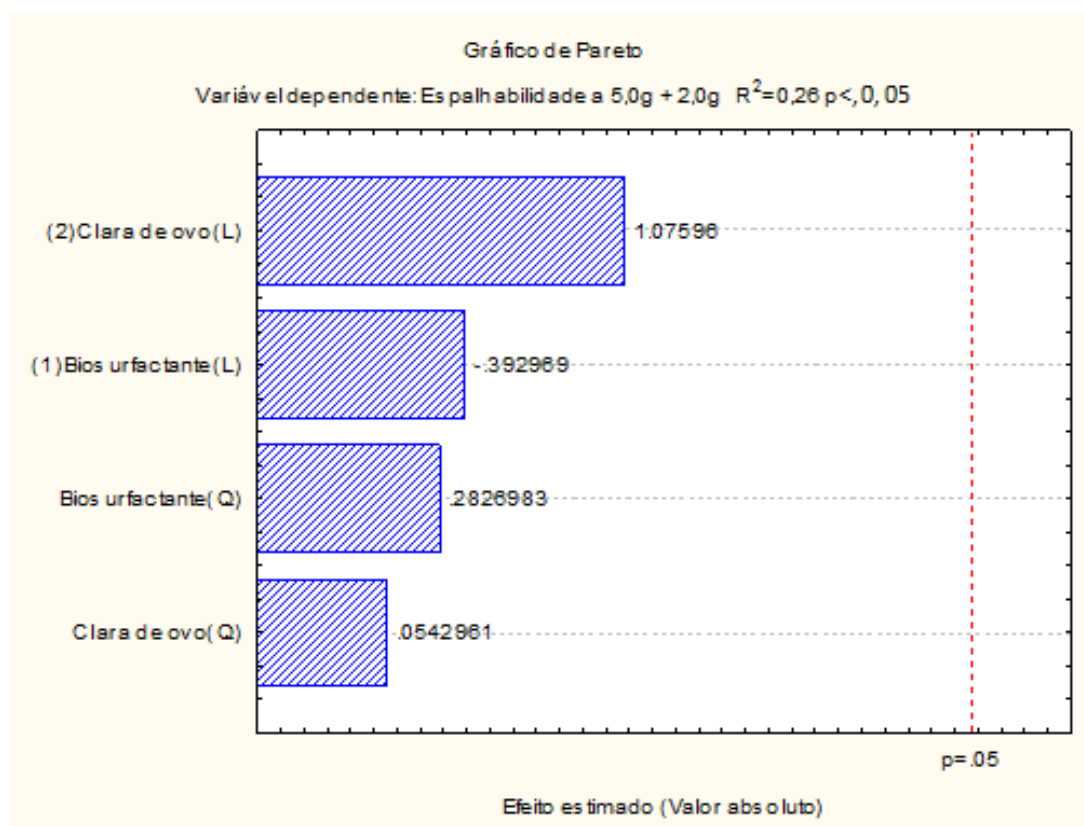
Fotografia 1: Estabilidade da emulsão sob microscopia ótica produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (tratamento 4).

Quando o ar é introduzido na massa durante o batimento, a proteína proveniente principalmente da clara de ovo sofre um desdobramento, de tal forma que sua porção lipofílica fica voltada para a fase gasosa, ou seja, para o interior das bolhas de ar, e sua porção hidrofílica permanece na fase aquosa. Este filme protéico também atua na formação e estabilização da espuma, juntamente com as moléculas do emulsificante. A presença do emulsificante na interface óleo-água auxilia indiretamente a aeração, porque os emulsificantes impedem o contato da gordura com a proteína, o que poderia desestabilizar o filme protéico (PAVANALLI;CICHELLO;PALMA,1990).

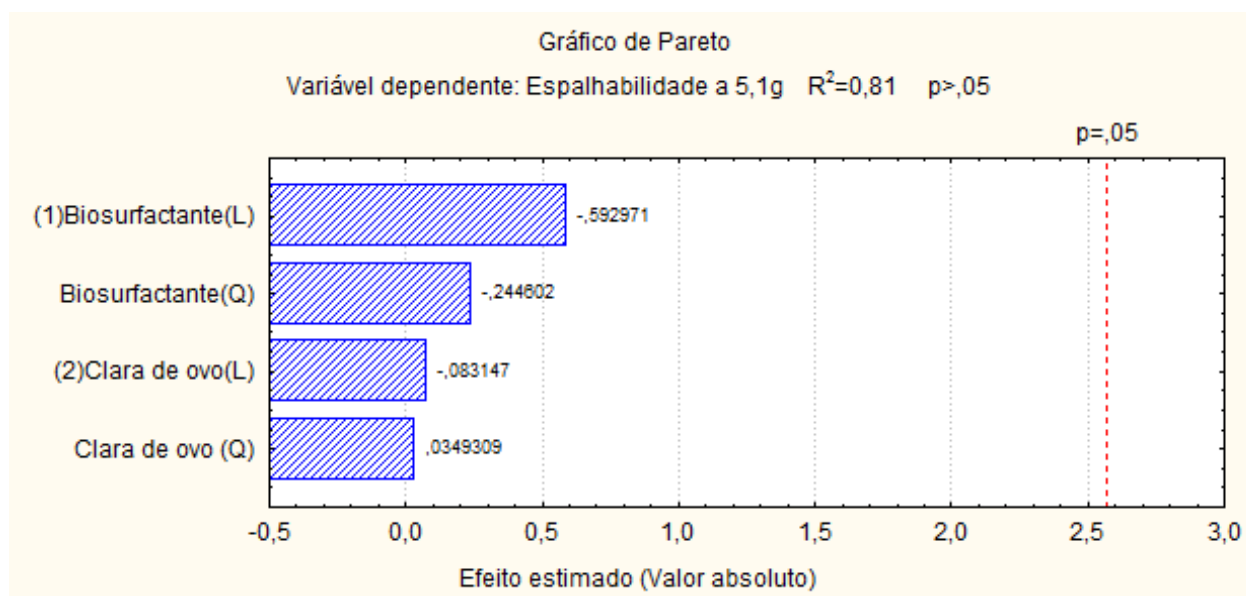
3.14. ESPALHABILIDADE DA EMULSÃO

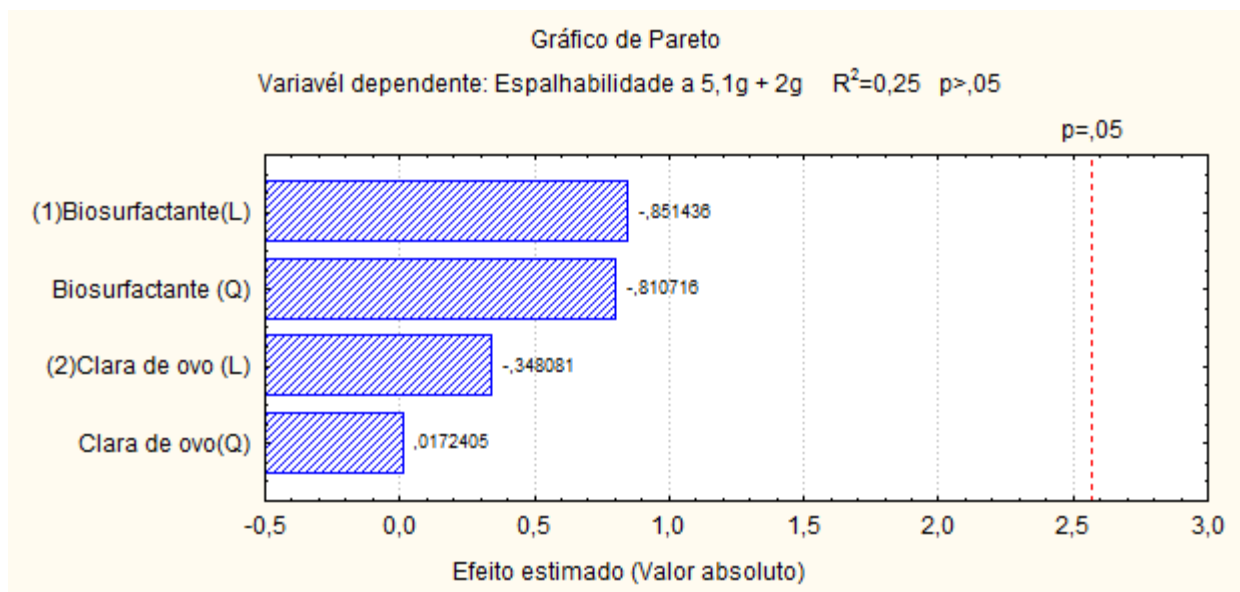
O gráfico de Pareto mostra que não houve influência significativa ($p \geq 0,05$) na espalhabilidade da emulsão com biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) e *Pseudomonas aeruginosa*. A clara de ovo do modelo linear teve influência negativa sobre a espalhabilidade da emulsão em todos os tratamentos (Figura 12), ou seja, quanto menor a concentração de clara de ovo maior a espalhabilidade da emulsão.



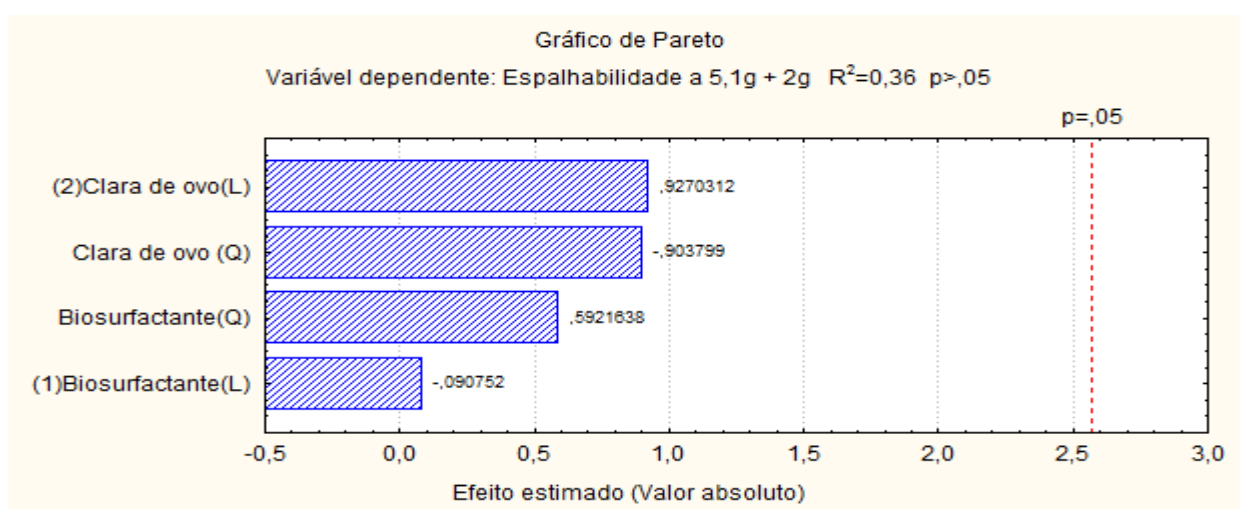
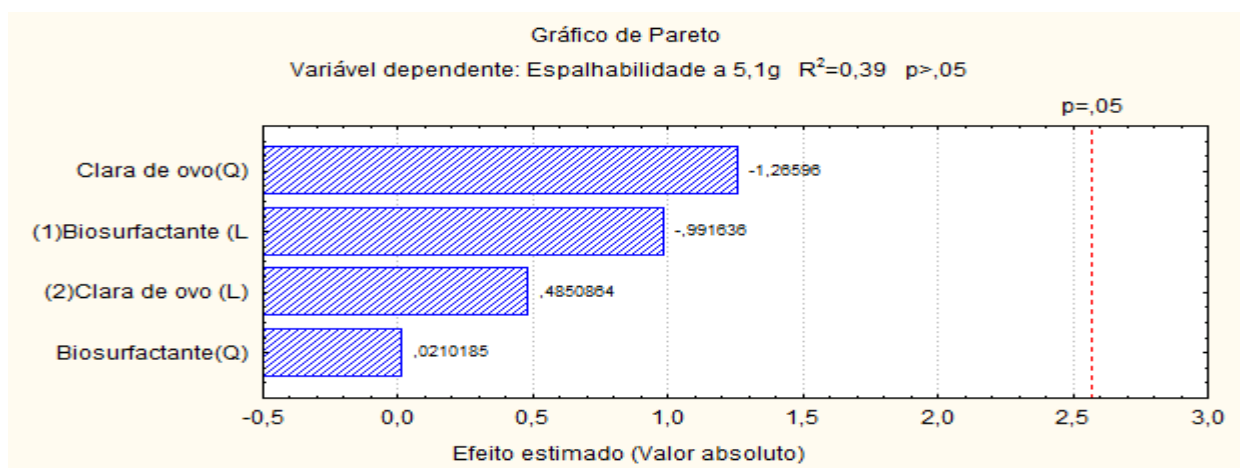


(A)





(B)



(C)

Figura 12 – Gráfico de Pareto: efeito do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) (A), *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) (B) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) (C) e da clara de ovo sobre a espalhabilidade da emulsão 5,1 g e 5,1g + 2g.

4. CONCLUSÃO

A maior produção de biosurfactante ocorreu nos meios de cultivo com alta concentração de carbono. O biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) apresentou maior índice de emulsificação em óleo de soja e, do *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) mostraram estabilidade da tensão superficial em todas as concentrações de NaCl e temperatura. A atividade antimicrobiana foi verificada pelo biosurfactante produzidos pelo *Bacillus subtilis*, no maior número de micro-organismos investigados. O biosurfactante produzido pela *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) mostrou melhor efeito na manutenção da estabilidade da emulsão quanto a sinérese, maior viscosidade e menor interferência no escurecimento da emulsão da clara de ovo. O biosurfactante produzido pelo *Bacillus sp.* (UFPEDA 450) teve influência direta no volume da espuma da emulsão. No entanto, para a utilização dos biosurfactantes produzidos pelo *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) há indicativo para aumentar da concentração de biosurfactante e redução do pH do meio com intuito de ampliar a estabilidade da emulsão.

De modo geral, as emulsões apresentaram coloração levemente amarelada e pH em torno de 7,9, promovendo dificuldade na estabilização da espuma, cuja desestabilização ocorreu a partir de 2 horas. Menores concentrações de clara de ovo promoveram maior espalhabilidade na emulsão e influenciaram diretamente no volume da espuma e na capacidade de retenção de água.

A aplicação dos biosurfactantes produzidos pelos micro-organismos investigados pode ser utilizado para ampliar a estabilidade de emulsões com clara de ovo. No entanto, sugere-se novos estudos com aumento da concentração de biosurfactante na emulsão, para ampliar o volume e estender sua estabilidade.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.T.; BRITO, A.C.F.; ALMEIDA, D.M.; MONTEIRO S.A.. Índice de emulsificação de biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Bacillus sp.* (UFPEDA 436). **26º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Foz de Iguaçu, 2011.

ANTUNES, M.de S. Estudo à microscopia eletrônica física de emulsões lipídicas utilizadas em misturas 3 em 1. **Rev Bras Nutr Clin**, n.1, p.45-53, 2007.

AQUINO, S.E.. Avaliação da atividade antimicrobiana fazer biosurfactante extraído de *Pseudomonas aeruginosa*. **Salão de Iniciação Científica – Livro de Resumos**, v.21 p.19-23,2009.

BARROS, F.F.C.; Quadros, C.P.; Júnior, M.R.M.; PASTORE, G.M.. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 409-414, 2007.

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O.. Adaptação no método de peso de gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da cmc de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v.27, n.3,p. 492-495, 2004.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A*. **Physicochemical and Engineering Aspects**, vol. 152, nº 1–2, p. 41-52, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos - Séries Temáticas Qualidade*, Brasília: ANVISA, v.1 p. 52, 2004.

BRITO, A.C.F.; ALMEIDA, L.T.. **Aplicação de Biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em emulsão de clara de ovo**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Orientador: Denise Milléo Almeida.

BRITTEN, M.;LAVOIE, L. Foaming Properties of Proteins as Affected by Concentration. **Journal of Food Science**, v.57, n.5, p.1219-1222, 1241, 1992.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. Tese

(Doutorado Engenharia e Ciência de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2008.

CHAVES-MONTES, B.E.; CHOPLIN, L. SCHAER, E. Rheological characterization of wet food foams. **Journal of Texture Studies**, v.38, n. 2, p. 236-252, 2007.

COLLA, L.M.; COSTA, VIEIRA J.A..Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, Rio Grande, v. 13, p. 85-103, 2003.

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

COSTA, G.A.N. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterizações e aplicações**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R.J. **Appl. Microbiol.** 2008, 104, 1675.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Em Biosurfactants: production, properties, applications**; Kosaric, N., ed.; Marcel Decker: New York, 1993, cap. 3.

FELIX, A.K.N., CAVALCANTE; K.F.,FRANÇA I.W.; OLIVEIRA, D.W.F.; MELO, V.M.M.; DE SANT ANA,H.B.; GONÇALVES, DE SANTIAGO-AGUIAR, R. S..Estabilidade e propriedade emulsificante da surfactina *Bacillus subtilis* LAMI005. **XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA**, Búzios, 2012.

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I. S.; SANTOS, A. F. A. B.; ARÁUJO, A. A.; MAIOR, A. M. S.; XIMENES, E. A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 704-709, 2007.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D..**Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65. 1992.

GLASER, L.A.; PAULSON, A.T.; SPEERS, R.A.; YADA, R.A.; ROUSSEAU, D.. Foaming behaviour of mixed bovine serum albumin-protamine system. **Food Hydrocolloids**, v.21, p. 495-506, 2007.

GOUVEIA, E.R.; DUARTE M.D.;LIMA G.M.S.; ARAÚJO J.M.. Bactérias produtoras de Biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.30, p 39–45, 2003.

IZQUIERDO,P; ESQUENA, J.; TADROS, T.F.; DEDEREN, J.C.; GARCIA, M.J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C.. Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method. **Langmuir**. v. 18, 26-30, 2002.

JOE, M. M.; BRADEEBA, K.; PARTHASARATHI, R.; SIVAKUMAAR, P. K.; CHAUHAN, P. S.; TIPAYNO, S.; BENSON, A.; AS, T. Development of surfactinbased nanoemulsion formulation from selected cooking oils: Evaluations for antimicrobial activity against selected food associated microorganisms, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**,v.43,p.172-180,2012.

KHOURYIER, H. A.; ARAMOUNI, F. M; HERALD, T. J. Physical, chemical and sensory properties of sugar-free jelly, Manhattan. **Journal of Food Quality, Wastport**, v. 28, n. 2, p. 179-190, 2005.

LIMA,T.M.S.. **Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

LOGARAJ, T.V.; BHATTACHARYA S.; UDAYA SANKAR K.; VENKATESWARAN G..Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage. **Food Chem.**, v. 106, p. 937–943, 2008.

MONTEIRO, S.A.. **Caracterização Molecular e Estrutural de Biossurfactantes Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**. Tese (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85. P. 111-125, 2001.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O. Trends Food Sci. Technol. 2007, 18.

PAVANELLI, A.P.; CICHELO, M.S.; PALMA, E.J. Emulsificantes como agentes de aeração em bolos. **Food Ingredients**, n. 02, p. 34-38, set./out. 1990.

REMEUF, F.; MOHAMMED, S.; SODINI, I.; TISSIER, J.P. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. **International Dairy Journal**, v.13, p.773-782, 2003.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. Estudo da estabilidade de biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju. **4º PDPETRO**, Campinas, 2007.

ROMERO, A.; CARDOBÉS, F.; PUPPO, M.C.; GUERRERO, A.; BENGOCHEA, C. Rheology and droplet size distribution of emulsions stabilized by crayfish flour. **Food Hydrocolloids**, v.22, n.6, p.1033-1043, 2008.

SANTOS, L.V.. **Emulsificantes – modo de ação e utilização nos alimentos**. 2008. 39f. Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Química de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

SHAW, D.J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. Editora Edgard Blucher Ltda. 181p., 1970.

SILVA, S.N.L.; SILVA, A.F.; FARIAS, C.B.B.F.; SANTOS, D.K.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO, L.A.. Estabilidade do biossurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em glicerol frente à condições ambientais específicas. **25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Porto de Galinhas, 2009.

SIRTORI, L.R.. **Purificação e caracterização de uma bacteriocina produzida por *Bacillus sp.*** p45. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.

SKELLAND, A. H. P. In: **NON-NEWTONIAN FLOW AND HEAT TRANSFER**. New York: John Wiley & Sons, 1967, p. 469.

SOUZA, F.L.C.. **Desenvolvimento de bases emulsionadas de silicone e água e avaliação comparativa com bases emulsionadas de óleo e água para uso externo de uso mais comum em manipulação.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

VOLLENBROICH, D; OZEL, M; VATER, J; KAMP, R. M; PAULI, G. **Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*.** *Biologicals*, n. 25, p. 289-297, 1997.