

Sistema FIEB



PELO FUTURO DA INOVAÇÃO

CENTRO UNIVERSITÁRIO SENAI CIMATEC

Programa de Pós-Graduação em Gestão e Tecnologia Industrial

**MÁRCIO COSTA PINTO DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS*,  
USANDO BORRA ORIGINADA NO REFINO DE ÓLEO  
VEGETAL DE SOJA E ALGODÃO COMO SUBSTRATO**

Salvador

2023

**MÁRCIO COSTA PINTO DA SILVA**

**PRODUÇÃO D SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS*,  
USANDO BORRA ORIGINADA NO REFINO DE ÓLEO  
VEGETAL DE SOJA E ALGODÃO COMO SUBSTRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gestão e Tecnologia Industrial do Centro Universitário SENAI CIMATEC como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Gestão e Tecnologia Industrial.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Edna dos Santos Almeida.  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Érika Durão Vieira.

Salvador

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro Universitário SENAI CIMATEC

S586p Silva, Márcio Costa Pinto da

Produção de surfactina por *Bacillus subtilis*, usando borra originada no refino de óleo vegetal de soja e algodão como substrato / Márcio Costa Pinto da Silva. – Salvador, 2023.

101 f. : il. (algumas color).

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna dos Santos Almeida. Coorientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Durão Vieira.

Tese (Doutorado em Gestão e Tecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação,  
Centro Universitário SENAI CIMATEC, Salvador, 2023. Inclui referências.

1. Surfactina. 2. Borra oleosa - Soja. 3. Borra oleosa - Algodão. 4. *Bacillus subtilis*.  
5. CLAE. I. Centro Universitário SENAI CIMATEC. II. Almeida, Edna dos Santos. III.  
Vieira, Érika Durão. IV. Título.

CDD 660.281

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SENAI CIMATEC****Doutorado em Gestão e Tecnologia Industrial**

A Banca Examinadora, constituída pelos professores abaixo listados, aprova a Defesa de Doutorado, intitulada "Produção de surfactina por B subtilis, usando borra originada no refino de óleo vegetal de soja e algodão como substrato" apresentada no dia 01 de dezembro de 2022, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutora em Gestão e Tecnologia Industrial.

Assinado eletronicamente por:  
Edna dos Santos Almeida  
CPF: \*\*\*.903.998-\*\*  
Data: 07/12/2022 16:26:13 -03:00



Orientadora:

**Prof.ª Dr.ª Edna dos Santos Almeida**  
SENAI CIMATEC

Assinado eletronicamente por:  
Erika Durão Vieira  
CPF: \*\*\*.576.497-\*\*  
Data: 09/12/2022 17:32:57 -03:00



Coorientadora:

**Prof.ª Dr.ª Erika Durão Vieira**

Assinado eletronicamente por:  
Jeancarlo Pereira dos Anjos  
CPF: \*\*\*.513.006-\*\*  
Data: 06/12/2022 15:56:12 -03:00



Membro Interno:

**Prof. Dr. Jeancarlo Pereira dos Anjos**  
SENAI CIMATEC

Assinado eletronicamente por:  
Fernando Luiz Pellegrini Pessoa  
CPF: \*\*\*.470.585-\*\*  
Data: 06/12/2022 15:47:44 -03:00



Membro Interno:

**Prof. Dr. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa**  
SENAI CIMATEC

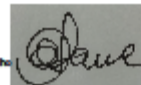
Assinado eletronicamente por:  
César Augusto Piedrahita Aguirre  
CPF: \*\*\*.090.798-\*\*  
Data: 06/12/2022 17:10:57 -03:00



Membro Externo:

**Prof. Dr. César Augusto Piedrahita Aguirre**  
UFBA

Assinado eletronicamente por:  
Alessandra Argolo Espírito Santo Carvalho  
CPF: \*\*\*.246.366-\*\*  
Data: 16/12/2022 06:22:11 -03:00



Membro Externo:

**Prof.ª Dr.ª Alessandra Argolo Espírito Santo  
Carvalho**

UniFTC

*“Ninguém acende uma lâmpada e a cobre com um vaso ou a põe debaixo da cama, mas põe-na sobre um castiçal para iluminar, pois não há coisa secreta que não venha a ser revelada...”*

Lucas, cap. 8, v. 16.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelo DOM da vida que Ele me proporciona, quando aos 59 anos concluo este doutorado. Fiz uma opção inversa na minha vida profissional: trabalhei por 38 anos, para, mais recentemente, pudesse voltar ao mundo acadêmico. Nada é por acaso, pois observei que a vida nos faz ligar pontos. Com certeza, sem a maturidade que tenho hoje, não conseguiria fazer este trabalho com a experiência acumulada e motivação.

A minha orientadora Dra. Edna, pela dedicação e presteza por todo o tempo, principalmente, nas minuciosas formatações.

A minha coorientadora Dra. Érika, que muito me ensinou sobre este belo mundo vivo, microscópico, como também pelo tempo que se dedicou a me ouvir, nas horas difíceis, tomado por emoções.

Aos professores participantes da banca de qualificação e de defesa, Dra. Alessandra, Dr. César, Dr. Jeancarlo e Dr. Fernando, por terem contribuído com informações bem pertinentes para que este trabalho fosse apresentado de forma impecável.

A meu filho Ivan, colega de profissão, amigo, sempre, pelo acolhimento em sua casa, em 2021, em Évora, Portugal, quando fui fazer meu doutorado sanduíche. O aprendizado técnico e nossas conversas nos engrandeceu como profissionais e seres humanos.

Aos familiares e, em particular, a minha mãe, que aos 85 anos, não entende do porquê, até hoje, eu tanto estudo (rs)!

Aos professores Dra. Rafaela Phoenix e Dr. Luís Martins pelo acolhimento técnico na Universidade de Évora, em Portugal.

A Instituição Centro Universitário SENAI CIMATEC pelo apoio em seus laboratórios e à FAPESB pelo apoio financeiro a este trabalho.

A cada pessoa que me ajudou no desenvolvimento deste trabalho: professora Dra. Bruna, Eliete, aos alunos de IC, em particular a Ana Verenna, e ao colega Gustavo Santos pelo auxílio no estudo de viabilidade. Aos colegas de turma e tantos outros que cruzei neste caminho.

Ao colega de doutorado Carlos Tosta, nestes 3 anos cultivamos uma boa amizade.

Enfim, deixo este trabalho como um legado a ser utilizado para o bem da Humanidade e do Meio Ambiente.

## RESUMO

Os biossurfactantes são compostos ativos, produzidos por microrganismos, com capacidade de reduzir a tensão superficial. Estes compostos possuem as seguintes vantagens sobre os surfactantes derivados de petróleo: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e produção a partir de fontes renováveis, porém, tem, em geral, alto custo de fabricação. A redução destes custos na produção de biossurfactantes está diretamente ligada ao custo do substrato. Por outro lado, na industrialização de óleos vegetais é gerada a borra oleosa, sendo que este subproduto alcança baixo preço de mercado e é potencial substrato para bactérias fermentativas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de reaproveitamento desta borra oleosa como substrato para a produção do biossurfactante surfactina. A metodologia consistiu na caracterização da borra através de análises físico-química e cromatográficas, seguida da etapa de inoculação e fermentação dos microrganismos *Bacillus subtilis* em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de borra e glicose no substrato, mantendo as outras variáveis constantes, para avaliar a composição do substrato que resultaria na maior concentração final do produto. Foi elaborado um planejamento experimental estrela envolvendo 11 ensaios de fermentação. Em seguida, foi realizada a purificação do produto por meio de centrifugação e rota evaporação. Após estas etapas, foram feitas análises qualitativas do biossurfactante gerado, ou seja, a surfactina, por meio de teste de colapso da gota, índice de emulsificação, espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) e análise quantitativa através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A amostra com maior concentração de surfactina foi a que continha maior percentual de borra que de glicose: 6% de borra e 3% de glicose, sendo obtido 129 mg/l de surfactina. Com base neste experimento foi uma simulação escalonando para uma planta industrial para ser feita a análise de viabilidade econômica. Os indicadores mostraram que a produção pode ser viável economicamente, pois apresentou um índice de lucratividade de \$1,42 para cada \$1,00 investido, com taxa de retorno de 49,77%. Estes resultados demonstraram que a borra originada do resíduo do refino da mistura de óleo vegetal de soja e algodão pode ser um substrato adequado para produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis*.

**Palavras-chave:** Surfactina; borra oleosa - soja; borra oleosa - algodão; *Bacillus subtilis*; CLAE.

## ABSTRACT

### PRODUCTION OF SURFACTIN FOR *BACILLUS SUBTILIS*, USING SLUDGE ORIGINATED IN SOY AND COTTON VEGETABLE OIL REFINING AS A SUBSTRATE

Biosurfactants are active compounds, produced by microorganisms, with the ability to reduce surface tension. These compounds have the following advantages over petroleum-based surfactants: low toxicity, high biodegradability, and production from renewable sources, but they generally have a higher production cost. This cost is directly related to the cost of the substrate. On the other hand, in the industrialization of vegetable oils an oily sludge is produced. This byproduct has a low market price and is a potential substrate for fermentative bacteria. In this context, the objective of this study was to evaluate the reuse potential of this oily sludge as a substrate to produce biosurfactant surfactin. The methodology consisted of characterizing the sludge through physicochemical and chromatographic analyses, followed by inoculation and fermentation of *Bacillus subtilis* microorganisms in a culture medium containing different concentrations of sludge and glucose in the substrate, keeping the other variables constant, to evaluate the composition of the substrate that would result in the highest final concentration of the product. A star experimental design involving 11 fermentation trials was elaborated. Then, the product was purified by centrifugation and rotary evaporation. After these steps, qualitative analyzes of the generated biosurfactant, surfactin, were carried out using droplet collapsed test, emulsification index, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and quantitative analysis using high performance liquid chromatography (HPLC). The sample with the highest concentration of surfactin was the one that contained a highest percentage of sludge than glucose: 6% and 3% of glucose, resulting in 129 mg/L of surfactin. Based on this experiment, it was a scaling simulation was carried out for industrial plant to carry out the economic viability analysis. The showed that the production can be economically viable, as it presented a profitability index of \$1.42 for every \$1.00 invested, with a rate of return of 49.77%. These results demonstrated that the sludge originating from the refining residue of the vegetable oil mixture of soybean and cotton can be a suitable substrate to produce surfactin by *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** Surfactin; soybean oily sludge; cotton oily sludge, *Bacillus subtilis*; HPLC.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 - MOLÉCULA DA SURFACTINA .....  | 25 |
| FIGURA 2 - ESPECTOGRAMAS VIBRACIONAIS OBTIDOS POR EIVTF SIGMA PADRÃO E AMOSTRA DIALISADA E LIOFILIZADA, EXCRETADA POR <i>B. SUBTILIS</i> . ..... | 37 |
| FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA .....   | 40 |
| FIGURA 4 - TORRE DE CONTATO UTILIZADA NA NEUTRALIZAÇÃO DO ÓLEO .....   | 41 |
| FIGURA 5 - SAÍDA DA BORRA DA CENTRÍFUGA .....  | 42 |
| FIGURA 6 - PONTO DE COLETA DA BORRA PARA ANÁLISE .....   | 43 |
| FIGURA 7 - ASPECTO DA BORRA COLETADA PARA ANÁLISE QUÍMICAS À TEMPERATURA AMBIENTE .....  | 43 |
| FIGURA 8 - DETERMINAÇÃO DO ÓLEO NEUTRO .....   | 44 |
| FIGURA 9 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ESTRELA .....   | 49 |
| FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA .....   | 60 |
| FIGURA 11 - À ESQUERDA ÓLEO E ÁGUA; À DIREITA ÓLEO E SURFACTANTE.....  | 64 |
| FIGURA 12 - TESTE DE COLAPSO DA GOTA .....   | 65 |

## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 1 - FAIXA DE COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE ALGODÃO E SOJA .....   | 36  |
| TABELA 2 - QUANTIDADES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA PREPARO DOMEIO BASAL E SOLUÇÃO ESTOQUE .....                           | 48  |
| TABELA 3 - RELAÇÃO DOS PARÂMETROS CODIFICADOS DE GLICOSE E BORRA (% MASSA) .....  | 50  |
| TABELA 4 - MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL DAS VARIÁVEIS BORRA E GLICOSE COM VALOR (G) .....                        | 50  |
| TABELA 5 – RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO QUÍMICA DA BORRA OLEOSA.....  | 62  |
| TABELA 6 – RESULTADOS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA GASOSA PARA OS ÉSTERES DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA BORRA OLEOSA. ....    | 63  |
| TABELA 7 – COMPARATIVO COM RESULTADO DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA BORRA E DADOS DA LITERATURA .....                         | 64  |
| TABELA 8 - ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO 24 HORAS: MÉDIA DO EXPERIMENTO 6, FEITO EM DUPLICATA .....                               | 66  |
| TABELA 9 - RESULTADOS DAS AMOSTRAS ANALISADAS VIA CLAE.....   | 688 |
| TABELA 10 - CÁLCULO DO CAPEX UTILIZANDO OS SOFTWARES: SUPER PRO DESIGNER E DE ANÁLISE ECONÔMICA DE PROCESSOS QUÍMICOS ..... | 72  |

## LISTA DE GRÁFICOS

|  |    |
|--|----|
| GRÁFICO 1 - CROMATOGRAMA, OBTIDO POR CLAE-DAD, DA SOLUÇÃO PADRÃO DE SURFACTINA (125 MG L <sup>-1</sup> ), CONTENDO A IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DAS CINCO ISOFORMAS DO ANALITO..... | 58 |
| GRÁFICO 2 - CURVA ANALÍTICA OBTIDA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA PRESENTE NAS AMOSTRAS 1 A 12 DO EXPERIMENTO 6. ....  | 59 |
| GRÁFICO 3 - LEITURA AMPLIADA DO EIVTF DAS 5 AMOSTRAS ANALISADAS, FREQUÊNCIA: 500 A 4500 CM-1 .....   | 67 |
| GRÁFICO 4 - CROMATOGRAMA DA AMOSTRA 6 APRESENTANDO OS PICOS .....  | 69 |
| GRÁFICO 5 - COMPARATIVO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA DAS 11 AMOSTRAS .....  | 69 |
| GRÁFICO 6 - CURVAS DE CRESCIMENTO DA BIOMASSA, CONSUMO DE SUBSTRATO E PRODUÇÃO DE SURFACTINA, SIMULADA DA AMOSTRA 6 .....  | 70 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| QUADRO 1 - PRINCIPAIS CLASSES DE BIOSSURFACTANTES E MICRORGANISMOS .....                               | 21 |
| QUADRO 2 - MICRORGANISMOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE BIOSSUFACANTES .....                               | 29 |
| QUADRO 3 - CLASSIFICAÇÃO CIENTÍFICA DO BACILLUS SUBTILIS.....  | 30 |
| QUADRO 4 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR MICRORGANISMOS EM<br>DIFERENTES SUBSTRATOS ..... | 32 |
| QUADRO 5 - PESO DOS REAGENTES PARA PREPARO DO MEIO DE CRESCIMENTO .....                                | 47 |
| QUADRO 6 - CÁLCULO DOS ÍNDICES ECONÔMICOS DA PLANTA DE SURFACTINA PROJETADA .....                      | 73 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>ATP</b>             | Adenosina Trifosfato  |
| <b>BCA</b>             | Bagaço de Cana de Açúcar                                    |
| <b>CG</b>              | Cromatografia Gasosa  |
| <b>CIMATEC</b>         | Centro Integrado de Manufatura e Tecnologia                 |
| <b>CLAE</b>            | Cromatografia de Alta Eficiência                            |
| <b>CMC</b>             | Concentração Micelar Crítica                                |
| <b>D</b>               | Coefficiente de Difusão                                     |
| <b>DLS</b>             | Espalhamento de Luz Dinâmico                                |
| <b>DQO</b>             | Demanda Química de Oxigênio                                 |
| <b>EDTA</b>            | Ethylenediamine Tetraacetic Acid                            |
| <b>E24</b>             | Índice de Emulsificação                                     |
| <b>FTIR</b>            | Espectroscopia do InfraVermelho com Transformada de Fourier |
| <b>HTP'S</b>           | Hidrocarbonetos Totais do Petróleo                          |
| <b>MEOR</b>            | Microbial Enhanced Oil Recovery                             |
| <b>P</b>               | Concentração Volumétrica do Produto                         |
| <b>Po</b>              | Concentração do Produto do Início do Cultivo                |
| <b>Pp</b>              | Produtividade em Produto                                    |
| <b>Ppan</b>            | 4'fosfopantetoinil  |
| <b>Pt</b>              | Concentração Volumétrica de Produto (mg/l)                  |
| <b>Px</b>              | Produtividade da Biomassa                                   |
| <b>Rh</b>              | Raio Hidrodinâmico  |
| <b>Rp</b>              | Velocidade de Formação de Produto                           |
| <b>RPM</b>             | Rotação por Minuto  |
| <b>Rs</b>              | Velocidade de Consumo do Substrato                          |
| <b>Rx</b>              | Velocidade de Crescimento de Microrganismo                  |
| <b>SDS</b>             | Dodecil Sulfato de Sódio                                    |
| <b>SENAI</b>           | Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial                 |
| <b>t</b>               | Tempo de Cultivo  |
| <b>UV</b>              | Ultravioleta  |
| <b>X</b>               | Concentração da Biomassa Seca                               |
| <b>Xo</b>              | Concentração da Biomassa Seca no Início do Cultivo          |
| <b>Xt</b>              | Concentração da Biomassa Seca                               |
| <b>Yp/x</b>            | Fator de Conversão de Células em Produto                    |
| <b>Y<sub>x/s</sub></b> | Fator de Conversão de Substrato em Biomassa                 |

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>15</b> |
| 1.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA .....   | 18        |
| 1.2 OBJETIVO.....   | 18        |
| 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 18        |
| 1.4 ORGANIZAÇÃO DO DOCUMENTO .....  | 18        |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>   | <b>20</b> |
| 2.1 BIOSSURFACTANTES .....  | 20        |
| 2.1.1 <i>Tipos de Biossurfactantes</i> .....  | 21        |
| 2.1.2 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES .....   | 22        |
| 2.1.3 A SURFACTINA.....   | 25        |
| 2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES .....   | 28        |
| 2.2.1 BACILLUS SUBTILIS COMO MICRORGANISMO PRODUTOR DA SURFACTINA .....                             | 29        |
| 2.3 SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES .....  | 32        |
| 2.3.1 A BORRA OLEOSA .....  | 35        |
| 2.4 TIPOS DE ANÁLISES PARA DETECÇÃO DE BIOSSURFACTANTES .....                                       | 36        |
| 2.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE ECONÔMICA DA UNIDADE INDUSTRIAL DE SURFACTINA .....                      | 38        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>  | <b>39</b> |
| 3.1 DESCRIÇÃO DA EMPRESA GERADORA DO RESÍDUO BORRA OLEOSA .....                                     | 41        |
| 3.2 ANÁLISES QUÍMICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA BORRA.....   | 43        |
| 3.2.1 <i>Determinação do óleo neutro</i> .....  | 44        |
| 3.2.2 <i>Determinação do pH</i> .....   | 45        |
| 3.2.3 <i>Determinação do teor de resíduos saponificáveis</i> .....                                  | 45        |
| 3.2.4 <i>Análise de umidade</i> .....   | 45        |
| 3.2.5 <i>Análise de ácidos graxos</i> .....   | 45        |
| 3.3 PRODUÇÃO DA SURFACTINA POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....                                       | 46        |
| 3.3.1 <i>Preparo do meio de crescimento e incubação</i> .....                                       | 46        |
| 3.3.2 <i>Enriquecimento do substrato e crescimento do B. subtilis no meio borra / glicose</i> ..... | 47        |
| 3.3.3 <i>Combinação das Fontes de Carbono</i> .....   | 48        |
| 3.3.4 <i>Cinética de crescimento</i> .....  | 51        |
| 3.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE .....   | 53        |
| 3.4.1 <i>Primeira centrifugação com recolhimento do sobrenadante</i> .....                          | 54        |
| 3.4.2 <i>Segunda Centrifugação</i> .....  | 54        |
| 3.4.3 <i>Extração Líquido-Líquido e Terceira Centrifugação</i> .....                                | 55        |
| 3.4.4 <i>Rotaevaporação e Ressuspensão</i> .....  | 55        |
| 3.5 ANÁLISES QUALITATIVAS PARA DETECÇÃO DO BIOSSURFACTANTE .....                                    | 56        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.5.1 <i>Teste de colapso da gota</i> .....   | 56         |
| 3.5.2 <i>Índice de Emulsificação em 24 horas (IE24)</i> .....   | 56         |
| 3.6 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE SURFACTINA .....  | 57         |
| 3.6.1 <i>Análise Quantitativa para determinação da surfactina utilizando CLAE-DAD</i> .....   | 57         |
| 3.7 ANÁLISE VIABILIDADE ECONÔMICA.....  | 59         |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....   | <b>62</b>  |
| 4.1 ANÁLISE DA BORRA .....  | 62         |
| 4.2 ANÁLISES QUALITATIVAS DA PRODUÇÃO DE SURFACTINA.....  | 64         |
| 4.2.1 TESTE DE COLAPSO DA GOTA .....  | 64         |
| 4.2.2 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO 24 HORAS (IE24) .....   | 65         |
| 4.2.3 RESULTADOS DA ANÁLISE DA ESPECTROSCOPIA DO INFRA VERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (EIVTF) .....                                       | 66         |
| 4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DA SURFACTINA USANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....  | 68         |
| 4.4 FATORES DE CONVERSÃO E RENDIMENTO DA SURFACTINA.....  | 70         |
| 4.5 ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÔMICA.....   | 72         |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....   | <b>74</b>  |
| 5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....  | 74         |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>76</b>  |
| <b>APÊNDICE 1: PLANILHAS COM RESULTADOS (IE24) PARA OS 6 GRUPOS DE EXPERIMENTOS COM DIFERENTES PARES DE BORRA E GLICOSE EM % EM MASSA</b> ..... | <b>91</b>  |
| <b>APÊNDICE 2: PLANILHAS COM CÁLCULO DO CUSTO OPERACIONAL (OPEX) DA PLANTA INDUSTRIAL DE SURFACTINA</b> .....                                   | <b>97</b>  |
| <b>APÊNDICE 3: PLANILHA COM RELAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS QUE COMPÕE A PLANTA INDUSTRIAL DE SURFACTINA</b> . .....                                   | <b>99</b>  |
| <b>APÊNDICE 4: PRODUÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA</b> .....  | <b>100</b> |





## 1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos presentes, normalmente, em detergentes. Essas moléculas têm um caráter anfipático, contendo uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica e são derivados da cadeia petrolífera (MOHAMADD *et. al.*, 2010). Os biossurfactantes têm características semelhantes aos surfactantes, sendo de origem biológica, sintetizado por microrganismos e têm grande capacidade de reduzir a tensão superficial de líquidos. Suas moléculas são complexas e, semelhante aos surfactantes, possuem uma porção hidrofóbica com pequena afinidade ao meio aquoso e um grupo hidrofílico, fortemente atraído pelo meio aquoso (ANTUNES, *at. al* 2013).

Os biossurfactantes possuem baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, com produção a partir de fontes renováveis (NITSCHKE *et. al.*, 2010), com amplo espectro de propriedades físico-químicas, incluindo também, redução da tensão interfacial, baixos valores de Concentração Micelar Crítica (CMC) e capacidade de formar e estabilizar emulsões de óleos em água (VOLKMANN; JENSKE; KREMER, 2017). Devido à vantagem de serem mais biodegradáveis quando comparados com os surfactantes de origem química, os biossurfactantes são mais apropriados para serem empregados em vários tipos de indústrias como: de higiene oral que utiliza este produto associados à quitosana fúngica para promover a saúde bucal; na indústria alimentícia como emulsificante e nas de cosméticos e farmacêutica (MORAIS; ANGELIS, 2012; AUGUSTYN; POTT; TADIE 2021).

A surfactina é um biossurfactante produzido por uma bactéria do gênero *Bacillus* e tem alta capacidade de reduzir a tensão superficial da água de  $72 \text{ mN m}^{-1}$  para  $27 \text{ mN m}^{-1}$ , em baixas concentrações (MARIM; LIMA; BONA, 2015). Por ter alta capacidade de quebrar a tensão superficial da água, a surfactina tem um amplo leque de aplicações, tanto na biorremediação com a dispersão no derramamento de óleos e remoção de resíduos de óleo em tanques de estocagem, como na recuperação terciária do petróleo e nas formulações de herbicidas e pesticidas (AUGUSTYN; POTT; TADIE 2021).

Entretanto, a produção de biossurfactantes ainda é limitada devido ao seu alto custo, agregada a uma baixa produtividade e uso de substratos (meios de cultivo) com altos valores comerciais. Somente os substratos equivalem a 30% dos custos totais de produção e 50% do custo do processo de fermentação (FRANÇA *et. al.*, 2014; UMAR *et. al.*, 2021). Contudo os metabólitos produzidos a partir de substratos mais baratos, renováveis e através de processos economicamente viáveis têm potencial de diminuir os custos de produção, sendo vantajoso a

produção de biossurfactantes por resíduos agroindustriais, possibilitando a diminuição de custos associados (MOHAMADD *et. al.*, 2010).

Desta forma, a viabilidade econômica da produção de biossurfactantes, em nível industrial, está diretamente ligada ao custo do meio de cultura (substrato). Neste sentido, a utilização de resíduos ou subprodutos industriais representam uma excelente forma para a redução de custos na produção, além de ser ambientalmente recomendado, principalmente, quando o resíduo possui cadeias longas de carbono, tornando seu descarte difícil e oneroso tratamento (BRUMANO; SOLER; SILVA, 2016). Por possuir longas cadeias de carbono os resíduos agroindustriais são um excelente substrato para o crescimento de microrganismos. (NITSCHKE *et. al.*, 2005).

Os resíduos agroindustriais com alto teor de lipídios e carboidratos atendem aos requisitos como substratos para produção de biossurfactante, adicionados a estes, macro e micronutrientes (BRUMANO; SOLER; SILVA, 2016). A literatura apresenta o uso de vários substratos de origem agroindustrial, dentre eles, Nitschke (*et. al.*, 2005) pesquisaram isolados de *Bacillus* cultivados em diferentes resíduos da indústria de alimentos, tais como o melaço, manipueira, soro de leite e meio sintético, apresentaram capacidade de produzir biossurfactantes, sendo a manipueira o substrato com maior potencial de produção. Banat (2014) cita estudos de produção de biossurfactante utilizando como substrato: cascas de batata e soja; palha de trigo. Também é relevante os estudos com uso do licor de maceração de milho, água residual do processamento de cereais (JIMOH; LIN, 2019), casca e farelo de arroz (CAMERINI, 2019), soro de leite e vinhaça (VERA, 2018), água residual da produção de café e bagaço de cana de açúcar (MARCELINO *et. al.*, 2019). Sena (*et. al.*, 2018) compararam outras fontes de carbono para produzir biossurfactantes: carboidratos, hidrocarbonetos, óleo de fritura residual e óleos vegetais. Porém estudos com uso de óleo de soja obtiveram os melhores resultados.

A produção de biossurfactantes empregando o resíduo da borra oleosa, oriunda do processo de refino de óleo vegetal, apresenta uma grande oportunidade de redução de custos da produção visto que o valor deste substrato é baixo. Vários autores citam a utilização de resíduo oleoso, de origem agroindustrial, como substrato para produção de biossurfactante. Rodrigues, (2016) utilizou melaço de soja, que é um coproduto gerado durante o processamento da soja, que tem alta produção e baixo valor comercial. Este autor utilizou as cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 para produzir rhamnolipídeos. Lotfabad (*et. al.*, 2016) citam a utilização de resíduo de óleo de soja, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* MR01, para produção de rhamnolipídeos.

O biossurfactante raminolipídeo também foi produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando como substrato óleo de soja residual (NITSCHKE *et. al.*, 2010). Em outro artigo, Nitschke (*et. al.*, 2005) informaram a produção de biossurfactante raminolipídeo através da *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como substrato o sabão de óleo de soja, que é o resíduo do refino do óleo de soja, sendo que os autores concluíram que o substrato com sabonete de soja é mais eficiente que outros substratos estudados. Este sabão ou sabonete de soja, denominado de borra, contém ácidos graxos que são removidos do óleo neutro por centrifugação contínua. Além dos ácidos graxos a borra contém: sais de sódio, água, triglicerídios, material saponificável e produtos da degradação do óleo.

Conforme informado nos parágrafos anteriores: Nitschke *et. al.* (2005); Lotfabad *et. al.*, (2016) e Rodrigues (2016) demonstraram o potencial do uso dos resíduos de óleo de soja como um substrato para produção de biosurfactantes. Devido a alta capacidade de reduzir a tensão superficial da água e sua ampla aplicabilidade, além da disponibilidade do *Bacillus subtilis*, foi escolhida a surfactina como biosurfactante a ser produzido neste experimento.

Estudos relatam a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis*, utilizando seguintes substratos: amido (FOX; BALA, 2000), óleo residual (NITSCHKE *et. al.*, 2010), farelo de trigo (BUENO, 2014), glicerina residual (FARIA, 2010). No entanto, nenhum autor relatou o uso do resíduo do refino do óleo de algodão ou mistura dos resíduos de refino de óleo de algodão e soja como substrato para produção da surfactina.

Neste sentido um potencial resíduo para servir como substrato com este fim é a borra gerada na etapa de neutralização do refino químico da mistura de óleos de soja e algodão, por esta conter uma proporção de mistura de ácidos graxos mais favorável à produção da surfactina. A utilização de substratos agroindustriais como matéria prima tornou-se uma alternativa bastante interessante e pode se tornar uma solução para as indústrias de surfactantes no alcance de produtos que não tenham origem na cadeia do petróleo.

No caso desta pesquisa, o biossurfactante vem como alternativa ao surfactante sintético não biodegradável, e/ou produzido a partir da cadeia do petróleo, com produção a partir de subproduto de processamento de óleo vegetal, o qual é uma fonte renovável, pois se materializa na: minimização da extração de recursos; maximização da utilização de resíduos com aumento da eficiência e desenvolvimento de novos modelos de negócios.

## 1.1 Definição do problema

A produção de biossurfactantes empregando o resíduo da borra oleosa apresenta uma grande oportunidade de redução de custos desta produção que está diretamente ligada ao custo do substrato.

Desta forma, tem-se o questionamento: a produção de biossurfactante surfactina a partir de substrato de baixo custo (borra oleosa), é viável técnica e economicamente?

## 1.2 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de reaproveitamento da borra originada no refino da mistura de óleo vegetal de soja e algodão para uso como substrato na produção da surfactina, utilizando o *B. subtilis*.

## 1.3 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo do trabalho, foi proposto como objetivos específicos:

- Caracterizar a borra oleosa através de análises físico-químicas e cromatográficas;
- Avaliar a produção da surfactina, utilizando o *B. subtilis* como inóculo;
- Realizar análises qualitativas e quantitativas das características físico-químicas da surfactina produzida;
- Acompanhar a cinética da fermentação para a produção da surfactina, com cálculo do rendimento;
- Realizar análise de viabilidade técnica e econômica, simulando, em escala industrial, uma planta a batelada (processo descontínuo) de produção da surfactina.

## 1.4 Organização do documento

Os capítulos seguintes se referem à estrutura do trabalho.

O capítulo 2 apresenta a revisão da literatura onde será abordado o conceito de biossurfactante, as principais características, os tipos, a aplicabilidade, os microrganismos e os substratos utilizados para produção de biossurfactantes e da surfactina.

No capítulo 3 está descrita toda a metodologia, materiais e equipamentos utilizados nos experimentos. É detalhado a caracterização da borra oleosa utilizada como substrato deste experimento; a produção da surfactina pelo processo fermentativo, descrevendo a proporção de borra oleosa e glicose utilizada para os 11 experimentos fermentativos; a cinética da fermentação; a purificação da surfactina e as análises qualitativas e quantitativas da surfactina produzida, bem como o estudo de viabilidade econômica de uma planta industrial de surfactina, com base nos processos de fermentação e purificação descritos na metodologia.

No capítulo 4 estão os resultados e a discussão das análises qualitativas e quantitativas. E, por fim, o capítulo 5 fecha com a conclusão do trabalho.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão de literatura foram abordados os seguintes pontos: os biossurfactantes, sua classificação e aplicações, incluindo um tópico específico sobre a surfactina, bem como os principais microrganismos produtores, incluindo o *B. subtilis*, tipos de substratos e a borra oleosa. Além destes, inclui um tópico de análises especiais e análise de viabilidade de uma planta industrial.

### 2.1 Biossurfactantes

O fenômeno da tensão superficial está presente em toda natureza e é responsável pela forma esférica de pequenas gotas de líquido. Esta forma adotada é em função da menor razão entre superfície e volume. As forças coesivas no interior do líquido são compartilhadas com as moléculas vizinhas. As moléculas na superfície do líquido não possuem moléculas vizinhas acima delas e exibem uma força mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento de forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado de tensão superficial (BEZERRA, 2012).

Os biossurfactantes são compostos de natureza anfipática, excretados principalmente, por microrganismos, que reduzem a tensão superficial do meio onde são produzidos. Esses compostos de superfície ativa encontram aplicação na indústria, agricultura, mineração, recuperação de petróleo e como emulsificadores em produtos farmacêuticos e cosméticos (ARAÚJO, 2018). As moléculas dos biossurfactantes são complexas e possuem uma porção hidrofóbica com pequena afinidade ao meio aquoso e um grupo hidrofílico, fortemente atraído pelo meio aquoso (ANTUNES *et. al.*, 2013). Os biossurfactantes são agentes ativos de superfície com amplo espectro de propriedades físico-químicas, incluindo redução da tensão superficial e interfacial, baixos valores de Concentração Micelar Crítica (CMC) e capacidade de formar e estabilizar emulsões de óleos em água (FARIA, 2010).

A capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial é uma função fundamental para as estruturas químicas que possuem moléculas anfifílicas, e é um requisito indispensável para formação de emulsões cineticamente estabilizadas. As moléculas de biossurfactantes adsorvem nas interfaces ar-líquido, líquido-líquido e sólido-líquido devido a sua natureza hidrofóbica-hidrofílica. Os surfactantes adsorvidos reduzem a energia livre da superfície por unidade de área. Esta energia está diretamente associada a tensão superficial e interfacial (JAHAN *et. al.*, 2020).

De acordo com a publicação da Allied Market Research (2019), o mercado global de surfactantes equivale a pouco mais de US\$ 43 bilhões, com taxa de crescimento anual de 5 % com previsão de alcançar em 2025 US\$ 66 bilhões. Os biossurfactantes já representaram 13% deste mercado de surfactantes em 2019 (US\$ 5,6 bilhões), com projeção de crescimento de 5,6%, ampliando sua representatividade para 15% do mercado total, em 2025, chegando a US\$ 9,9 bilhões, ou seja, praticamente duplicará o faturamento em 6 anos (MARKETS AND MARKETS, 2022). A variedade dos principais tipos de biossurfactantes e sua classificação será vista no subtópico a seguir.

### 2.1.1 Tipos de Biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química e origem microbiana. As principais classes abrangem os: glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos, conforme o quadro 1 (BUENO, 2014).

Quadro 1- Principais classes de biossurfactantes e microrganismos

| <b>Tipo de Biossurfactante</b>  | <b>Microrganismo</b>  |
|---|---|
| Glicolipídios   |   |
| -ramnolipídios<br>- soforolipídios<br>- trehalolipídios                             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Torulopsis bombicola, T. apícola</i><br><i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>                        |
| Lipopeptídios e Lipoproteínas   |   |
| - Peptídio-Lipídio<br>- Viscosina<br>- Serrawetina<br>- Surfactina<br>- Subtilisina | <i>Bacillus licheniformis</i><br><i>Pseudomonas fluorescens</i><br><i>Serratia marcescens</i><br><i>Bacillus subtilis</i><br><i>Bacillus subtilis</i> |

Fonte: adaptado de Bueno (2014).

Os glicolipídeos pertencem ao grupo de biossurfactantes mais estudados, geralmente formados por carboidratos (glicose, manose, galactose ou raminose), associados a uma longa cadeia carbônica de ácidos alifáticos ou hidroxí. Dentre os mais importantes estão os ramnolipídeos e os soforolipídeos (ROCHA, 2017).

Os lipopeptídeos e lipoproteínas são compostos cíclicos resultantes da condensação entre um ácido graxo e um oligopeptídeo. Tem altas atividades superficiais, com excelente eficiência tensoativa e potencial antibiótico. Entre estes compostos estão as surfactinas, gramicidinas e polimixinas. A surfactina, que será detalhada nesta tese, é o principal representante dos lipopeptídeos. (ROCHA, 2017).

Do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda estão sendo avaliados em relação aos sintéticos. Estratégias como a escolha de matérias primas de baixo custo, otimização dos processos fermentativos, redução dos custos de recuperação do produto e manipulação genética de linhagens produtoras têm sido avaliadas visando aumentar a competição dos biossurfactantes frente aos surfactantes sintéticos (MARIM; LIMA; BONA, 2015).

### 2.1.2 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes ou substâncias tensoativas dividem, preferencialmente, a interface entre fluídos com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio tais como óleo/água ou ar/água interfacial. Estas propriedades rendem a estes a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e formam micro emulsões nas quais os hidrocarbonetos podem solubilizar-se em água ou a água solubilizar-se em hidrocarbonetos (BUENO, 2010).

Portanto, estes podem ser utilizados em várias atividades industriais que envolvam o uso de surfactantes sintetizados quimicamente como: a indústria de petróleo, farmacêutica, médica, de cosméticos, na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, processamento de alimentos (textura), tratamento e processamento de metais, vestuário, processamento de polpas de papel, indústria de tinta, emulsões e floculação (SOUZA *et. al.*, 2021). Devido às suas propriedades físico-químicas, o uso dos biossurfactantes na indústria petroquímica parece ser mais adequado que a maioria dos surfactantes sintéticos, o que explica porque a maior parte da produção de biossurfactante é utilizada em processos relacionados a indústria petroquímica (PEREIRA *et. al.*, 2013).

Araújo (2021) trabalhou na aplicação de consórcios bacterianos, isolados de outros locais, como capazes tanto de degradar o óleo pesado quanto de produzir moléculas surfactantes durante a limpeza de ambientes contaminados por resíduos da indústria do petróleo.

As lamas ou lodos formados pelas frações de óleo pesado que se acumulam como depósitos sólidos no fundo dos tanques de armazenagem de óleo são altamente viscosas, não sendo possível a retirada pelo método convencional de bombeamento. Normalmente este tipo de limpeza requer lavagem com solvente ou limpeza manual, sendo ambos perigosos e caros. Uma alternativa para este processo de limpeza é a formação de uma emulsão óleo/água pelo uso de surfactante, promovendo a remoção da lama pelo processo de bombeamento e recuperação do resíduo após a quebra da emulsão. A aplicação de biossurfactantes neste processo foi iniciada na década de 70 e, nos anos 80 foram relatados os primeiros estudos em



pequena escala do uso do emulsan (produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus*) na limpeza de vasos contaminados por óleo (RICHTER *et. al.*, 1998).

Neste contexto, Alexandre (*et. al.*, 2015) demonstraram em seu estudo a viabilidade da aplicação de um ramnolípido produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 no tratamento de efluentes residuais das refinarias de petróleo, por meio da adição do biossurfactante em sistemas de lodo ativado. O autor obteve como resultado a redução de 52% de descarte de lodo residual rico em compostos orgânicos tóxicos, sem que a demanda química do oxigênio (DQO) fosse alterada. Isso indica uma ótima aplicabilidade dos biotensoativos como ferramenta no tratamento e minimização de resíduos e efluentes da indústria petroquímica.

Uma outra possibilidade de mercado para os biossurfactantes seria na indústria de petróleo para biorremediação/dispersão, tanto no solo quanto no mar, durante os derramamentos de óleo; remoção/mobilização de óleos incrustados em tanques de estocagem, rochas e areia do mar, aumentando assim a sua recuperação (BARATHI; VASUDEVAN 2001). Para Mulligan (2021), os biossurfactantes apresentam potencial no uso para remediação por causa de sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e eficácia.

Os ramnolípdeos, a surfactina e os sofrólípdeos estão se mostrando eficazes em métodos que dependem de solubilização e por isso são adequados em processos de recuperação microbiológica para ambientes contaminados por petróleo, processos de biodesulfurização, na agricultura, na lavagem de solo e em técnicas de análise de mistura de água em óleo (FENIBO *et. al.*, 2019).

Outra aplicação é a biorremediação de areias contaminadas com hidrocarbonetos por meio da aplicação de dois biossurfactantes, um de origem bacteriana e outro produzido por leveduras. O estudo de Chaprão (2015) comprovou que os bioprodutos tiveram uma eficácia de 70 a 90% na remediação da contaminação, índice superior ao dos surfactantes industriais aplicados para comparação. Não há necessidade de purificar os compostos tensoativos produzidos pelos microrganismos para a sua aplicação como agentes de remediação, o que tornaria a produção mais econômica. O biotensoativo de origem bacteriana (*Bacillus sp.*) atua melhor na biodegradação de derivados de petróleo, enquanto o produzido por *Candida sphaerica* é mais efetivo em operações avançadas de recuperação de óleos em geral (CHAPRÃO, 2015).

No trabalho de Gidudu e Chirwa (2020) verificou que os biossurfactantes podem ser utilizados para melhorar a separação de fases na recuperação de solo contaminado. Eles são capazes de aumentar a taxa de remoção dos contaminantes por meio do aumento da biodisponibilidade e da redução da tensão superficial e da formação de micelas (BULCÃO *et.*

*al.*, 2021). Outra aplicação para os biossurfactantes é na formação de emulsões que utilizam polímeros nas indústrias de pinturas, revestimento, asfalto, cimento, têxtil e de fibras, Além do emprego na remoção de metais pesados, no tratamento de água, na mineração, em carvoarias e na proteção de madeira (ARAÚJO, 2018).

Em processos de remediação *in situ* não é necessário o uso de biossurfactante purificado, uma vez que os nutrientes do meio de cultura e as bactérias produtoras de surfactante auxiliam a promover a biodegradação. Por razões óbvias, se a fonte de carbono for um hidrocarboneto é recomendável que seja feita a remoção dos hidrocarbonetos do meio de cultura para que a solução possa ser utilizada na recuperação de solo e/ou lençol freático contaminado. Os componentes hidrofóbicos dos poluentes orgânicos são difíceis de remover, sendo um problema particular para processos de remediação do solo. Sua disponibilidade para biodegradação é extremamente pequena. A aplicação de biossurfactantes para a remoção de poluentes hidrofóbicos tem como objetivo aumentar a biodisponibilidade e a biodegradabilidade destes compostos (KUYUKINA *et. al.*, 2001).

As indústrias de cosméticos e farmacêuticos utilizam grandes quantidades de surfactantes numa variedade de produtos, tais como: repelentes de insetos, antiácidos, pomadas para acne, produtos anti-caspa, soluções para lentes de contato, tintura para cabelos, desodorantes, esmaltes para unhas, batom, sombra, máscaras, pasta de dentes, produtos de limpeza de dentaduras, anti-transpirantes, lubrificantes de preservativos, produtos para bebê, cremes para os pés, produtos de depilação e hidratantes (BARROS *et. al.*, 2007).

Visando a diminuição do uso do lauril sulfato, um composto utilizado em cremes dentais, que possui propriedades espumante e antimicrobiana com um grande potencial alérgico, foi estudado o desenvolvimento de um produto de higiene oral que utiliza biossurfactantes associados à quitosana fúngica para promover a saúde bucal. Os biotensoativos produzidos pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 e *Bacillus cereus* UCP1615, e pela levedura *Candida bombicola* URM 3718, podem ser utilizados como substituintes dos surfactantes químicos, agindo como espumantes e antimicrobianos sem produzir efeitos adversos (FARIAS, 2019).

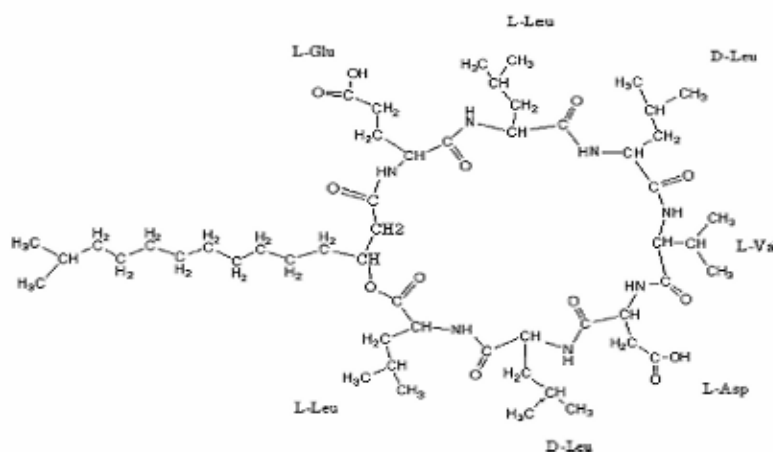
Na indústria alimentícia, a emulsificação tem papel importante na dispersão de fases e na formação da consistência e textura, bem como e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, na panificação e em produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras. Alguns produzidos por microrganismos estão sendo utilizados comercialmente, como por exemplo, o bioemulsificante produzido por *Candida utilis*

que tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (EHRHARDT, 2019). A seguir encontra-se um detalhamento a respeito da surfactina.

### 2.1.3 A surfactina

A surfactina é o principal representante dos lipopeptídeos, possui sete aminoácidos dispostos na seguinte sequência: (L-ácido glutâmico, L-leucina, D-leucina, L-valina, L-ácido aspártico, D-leucina e L-leucina), conforme a figura 1 (BUENO, 2010).

Figura 1 - Molécula da surfactina



Fonte: (BUENO, 2008).

Kakinuma (*et. al.*, 1969) determinaram a estrutura primária da surfactina, composta por um peptídeo de sete  $\alpha$ -aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo  $\beta$ -hidroxi com 12 a 16 átomos de carbono, formando um lipopeptídeo cíclico. As surfactinas possuem isoformas A, B, C e seus homólogos, conforme a sequência de aminoácidos e o número de átomos de carbono do ácido graxo formam os isômeros.

A isomeria química é um fenômeno observado quando duas ou mais substâncias orgânicas têm a mesma fórmula molecular, mas estrutura molecular e propriedades diferentes. Os isômeros são divididos em dois grandes grupos: isomeria constitucional – onde os compostos apresentam seus átomos conectados em ordens diferentes (fato observado na nomenclatura relacionada a fórmula estrutural) e estereoisomeria com estruturas onde os átomos estão conectados na mesma ordem, mas possuem arranjo diferente no espaço (geométrica) e com estruturas onde há a presença de um carbono tetraédrico capaz de desviar o plano da luz polarizada (óptica) (COSTA; DANTAS FILHO; MOITA, 2017).

A isoforma é a designação atribuída a cada uma das distintas formas de uma mesma macromolécula, que apenas diferem parcialmente na sua estrutura.

A surfactina “A”, , é a principal isoforma e apresenta a sequência de resíduos de aminoácidos N-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-C em sua porção peptídica. Os ácidos graxos presentes são:  $\beta$ -hidróxi iso C<sub>12</sub>, iso C<sub>13</sub>, anteiso C<sub>13</sub>, iso C<sub>14</sub>, iso C<sub>15</sub>, anteiso C<sub>15</sub>, n C<sub>15</sub>, anteiso C<sub>16</sub> e anteiso C. Há outras moléculas de surfactina, como o lipopeptídeo C<sub>12</sub> que possui uma cadeia de ácido graxo menor e o C<sub>15</sub>-surfactina-O-metil éster, ambos produzidos pelo *B. subtilis* HSO 121.10. As isoformas B e C se diferem no sétimo aminoácido, sendo Val e Ile para as isoformas respectivas (LIU; YANG; UM, 2008, p. 867).

Na análise do biotensoativo esterificado, as porções de ácido graxos foram identificadas como  $\beta$ -hidróxi iso C<sub>15</sub> e anteiso C<sub>15</sub> e o anel peptídico possuía a sequência N-Glu(OMe)-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-C. A composição da porção peptídica e de ácidos graxos  $\beta$ -hidróxi da molécula dependem das linhagens bacterianas produtoras e das condições de cultivo. (SEYDLOVÁ, SVOBODOVÁ, 2007, p. 124).

Há a necessidade de mais estudos sobre a síntese e moléculas produzidas por diferentes linhagens bacterianas, visando possuir um conhecimento aprofundado nas propriedades físico-químicas em séries homólogas e isoformas desses compostos, pois diferenças estruturais podem afetar a aplicação e efetividade dessas biomoléculas (LARINI et. al., 2017).

A biossíntese é baseada no conceito de transporte múltiplo onde os múltiplos cofatores 4'-fosfopantetoinil atuam como aceptor da cadeia de peptídeo em formação e também doam peptídeos para o próximo aminoácido ligado ao NPRS. Uma adenilação dependente de ATP, usada para ativar todos os sete aminoácidos que formam o heptapeptídeo na surfactina, antes de amarrar a cadeia peptídica a complexos enzimáticos distintos por meio de ligações de carboxitioéster (WU et. al., 2017).

As surfactinas naturais são misturas das isoformas com diferentes propriedades fisiológicas. As moléculas possuem no mínimo oito decapeptídeos com o número de carbono entre 13 e 16 no sistema dos anéis. A biossíntese da surfactina é realizada por mecanismos não-ribossomais e catalisada por diversas enzimas do complexo NPRS, formando o complexo Surfactin Synthase. “Este complexo é formado por quatro subunidades enzimáticas, as enzimas SrfA (E1A, 402 kDa), SrfB (E1B, 401 kDa), SrfC (E2, 144 kDa) e a SrfD (E3, 40 kDa) que desempenham um papel importante no início da produção do lipopeptídeo” (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010, p.120).

A surfactina está presente na área da saúde, pois a molécula apresenta funções antibacterianas, antifúngica, antiviral, antimicoplasma, inibidora do coágulo da fibrina, antimicoplasmático, veículo para a administração de drogas via pulmonar e é capaz de inibir a formação de biofilmes de outras bactérias, incluindo a patogênica *Salmonella*. Por conta da sua propriedade citotóxica que causa a apoptose das células cancerígenas, inibe o avanço de

metástases. Essa toxicidade a células é causada por conta da capacidade do biossurfactante de inativar as vias de sinalização química que garantem a sobrevivência celular. A surfactina produzida a partir de *B. subtilis* possui atividade antibiótica potente. Além disso, o biotensoativo tem um grande controle sob as proteínas que regulam o ciclo celular e que são fundamentais para o bloqueio do crescimento das células cancerígenas. (WU *et. al.*, 2017).

A surfactina possui atividade bactericida e é capaz de inibir a formação de biofilmes de outras bactérias, incluindo a patogêna *Salmonella*. Também apresentam aplicações terapêuticas, como antitumoral e de biocontrole (LARINI *et.al.*, 2017).

Como outros biossurfactantes, na área de meio ambiente, a surfactina tem um grande poder de promover a biodegradação de diversos compostos, principalmente de hidrocarbonetos. Neste contexto, Gonzaga (2013) apresenta a aplicação da surfactina como agente promotor da biorremediação de solos contaminados por petróleo, obtendo uma remoção de até 73% dos hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP'S) do solo. Pode ser utilizada também para a remoção de metais pesados contaminantes de corpos d'água. A surfactina aplicada para a remediação de mercúrio por conta capacidade de se ligar e formar complexos com os íons do contaminante, permitindo que 36.4% do mesmo fosse recuperado (CHEN *et. al.*, 2011).

A viabilidade de utilização do lipopeptídeo como um agente de biocontrole da bactéria *Acidovorax citrulli*, causadora da mancha-aquosa em plantas da família cucurbitaceae (melão). “A surfactina apresentou uma efetividade de 61,7% no controle de crescimento bacteriano após 4 dias de inoculação em brotos de melão” (FAN *et. al.*, 2017, pg.13).

As surfactinas apresentam atividade de superfície e emulsificação que favorecem sua aplicação ambiental. Como exemplo, o melhoramento da recuperação microbiológica avançada de petróleo (MEOR), que usa microrganismos e seus metabólitos para mobilizar o petróleo residual, ou seja, aquele que está preso nos poros das rochas por força capilar, além do uso em processos de biorremediação. O uso de surfactina em MEOR é promissor, pois esse biossurfactante apresenta vantagens eficazes, incluindo baixa toxicidade, maior biodegradabilidade e efetividade em temperaturas, salinidade e condições de pH extremas, bem como alta atividade interfacial aliada à baixa Concentração Micelar Crítica (CMC), (CHEN: CHEN; JUANG, 2008). Conforme Phulpoto (*et. al.*, 2020), a surfactina é um dos tipos de biossurfactante mais eficiente devido a sua alta capacidade emulsificante.

A atividade de biocontrole exercida pela surfactina compreende outra aplicação ambiental desse biossurfactante, a qual apresenta atividade bactericida e age de modo a desestabilizar a membrana fosfolipídica do fitopatógeno-alvo, resultando em lise da célula (DEBOIS *et. al.*, 2015). As características estruturais anfipáticas da surfactina possibilitam a

sua interação em macromoléculas de membranas celulares, como enzimas e lipopolissacarídeos (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

A atividade bactericida da surfactina encontra aplicabilidade na indústria de alimentos, onde a propriedade antimicrobiana pode reduzir em 62% a contaminação por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos. Este resultado demonstra como esse biotensioativo pode ser aplicado nos produtos, aumentando a durabilidade e segurança alimentar (PEREZ, 2014).

Em relação ao processo produtivo da surfactina, o mesmo ainda não está bem elucidado para aplicação em escala industrial, sendo a viabilidade econômica a principal barreira devido aos custos envolvidos, principalmente com substratos. A utilização de substratos não convencionais é uma alternativa para produção deste biossurfactante, bem como de outros para produção industrial em larga escala e de custo compatível (BARROS *et. al.*, 2007).

## **2.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes**

Conforme o quadro 2, os principais microrganismos produtores de biossurfactantes apontados na literatura são: *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Acinetobacter calcoaceticus* (PIRÔLLO, 2006; COSTA; NITSCHKE; CONTIERO, 2008; FARIA, 2010; LIMA, 2010; ANTUNES *et. al.*, 2013).

Quadro 2 - Microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes

| REFERÊNCIA                        | MICROORGANISMO                   | SUBSTRATO                       | BIOSSURFACTANTE            |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| COSTA; NITSCHKE, CONTIERO, 2008   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | Óleo, gordura e borra vegetal   | Ramnolipídeo               |
| PORTO; SANTOS; SARUBBO, 2014      | <i>Streptomyces</i>              | Óleos vegetal residual          | *                          |
| ANTUNES et al 2013                | <i>Chromobacterium violaceum</i> | Óleo de milho pós fritura       | *                          |
| CORREA et al, 2014                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | Milhocina borra de óleo vegetal | Ramnose                    |
| COSTA, 2010                       | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | Manipueira óleo de fritura      | Ramnolipídeo               |
| FARIA, 2010                       | <i>Bacillus subtilis</i>         | Glicerina residual              | lipopeptídeo<br>Surfactina |
| LIMA, 2010                        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | Óleo de soja residual           | Raminose                   |
| PIROLLO, 2006                     | <i>Pseudomonas</i>               | Borra de petróleo               | *                          |
| RODRIGUES, 2016                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | Melaço de soja                  | Ramnolipídeo               |
| EHRHARDT, 2019                    | <i>Bacillus subtilis</i>         | Resíduo de abacaxi              | Surfactina                 |
| MARIM; LIMA; BONA, 2015           | <i>Bacillus subtilis</i>         | Melaço de cana-de-açúcar        | Surfactina                 |
| ROVINA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2018 | <i>Bacillus subtilis</i>         | Casca da laranja                | Surfactina                 |
| ARAÚJO, 2018                      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | Glicose                         | Ramnolipídeo               |

\* não-identificado o biossurfactante predominante

Fonte: adaptado de Colla e Costa (2007).

### 2.2.1 *Bacillus subtilis* como microrganismo produtor da surfactina

O *B. subtilis* é uma das 40 espécies de bacillus mais estudadas na área de biotecnologia. Sua alta capacidade produtora de biossurfactantes torna-o uma bactéria de grande aplicabilidade na biotecnologia industrial e ambiental. (JÖNK, *et. al.*, 2014). São bactérias autóctones do solo, do tipo gram-positivas, aeróbias facultativas, não fotossintetizantes e com maior atividade em temperaturas médias de 25 a 35 °C, mas com alta capacidade de produzir esporos quando em condições adversas (PORTER; LEEUWENHOEK, 1976).

Os esporos do *Bacillus* têm uma morfologia elipsoide (FRITZE, 2004), com uma composição enzimática e química que possibilitam que esses microrganismos suportem extremos de pH e temperatura, dessecação, baixa disponibilidade de água, radiação UV e

produtos químicos como fertilizantes e pesticidas (DRIKS, 2004; PIGGOT; HILBER, 2004). Apesar de hoje serem considerados aeróbios facultativos, por muito tempo, foi afirmado que os *B. subtilis* eram estritamente aeróbios. Mas com diversos estudos e pesquisas, mostrou-se a capacidade dessas espécies de crescerem em anaerobiose, utilizando nitrito ou nitrato como aceptores finais de elétrons ou, na ausência destes, por fermentação em meio contendo glicose e piruvato ou glicerol como fonte de carbono (MARIM; LIMA; BONA, 2015).

O *B. subtilis* cresce em uma faixa de temperatura razoável (25 a 38 °C) e também é capaz de sobreviver em condições extremas por conta da sua capacidade de desenvolver estratégias de sobrevivências em situações como o estresse ambiental e a falta de nutrientes. A faixa de temperatura que a surfactina é secretada fica entre 25 e 37 °C, sendo 37,4 °C a temperatura ótima para o *Bacillus subtilis* DSM 3256. A presença de oxigênio é também um fator muito importante e, em um meio saturado com 30% de oxigênio dissolvido é onde ocorre uma maior produção. No âmbito nutricional, a presença de fontes cadeias carbônicas de 16 e 18 átomos, presentes nos ácidos graxos e de nitrogênio orgânico e/ou inorgânico são importantes. Os elementos traço como  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  possuem um papel essencial na produção da biosurfactina por *B. subtilis* pois são cofatores principais nos sistemas multienzimáticos de biossíntese (LARINI *et. al.*, 2017).

Apresentam crescimento de forma individual ou em pequenas cadeias. Possui mobilidade através do flagelo, alta taxa de crescimento, desenvolve-se em amplas variações de temperatura (15 a 70 °C) e pH (2 a 9,3) (KONEMAN, 2008; BUITRAGO *et. al.*, 2011). No quadro 3 é informada a classificação do *B. subtilis*.

Quadro 3 - Classificação científica do *Bacillus subtilis*

| REINO   | BACTÉRIA           |
|---------|--------------------|
| Filo    | <i>Firmicutes</i>  |
| Classe  | <i>Bacilli</i>     |
| Ordem   | <i>Bacillales</i>  |
| Família | <i>Bacillaceae</i> |
| Gênero  | <i>Bacillus</i>    |
| Espécie | <i>B. subtilis</i> |

Fonte: (KONEMAN, 2008).

Outra vantagem importante do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento em meio líquido e a ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000). Lima (*et. al.*, 2020) fizeram uma comparação de diversos microrganismos que se comportam como degradadores de hidrocarbonetos. No estudo realizado pelos autores foram isoladas 23 bactérias



que atuaram na presença de água contaminada por hidrocarbonetos, sendo que dentre as cepas as que melhores se comportaram na degradação de hidrocarbonetos foram as cepas de *B. subtilis*, apresentando-se potencialmente favoráveis ao seu uso em biorremediação (SANTOS *et. al.*, 2021).

Em razão de suas características, há uma grande contribuição para a utilização comercial deste microrganismo no controle biológico de diversas doenças de plantas causadas por fungos (BACKMAN; SPEKER; KROEMER, 2012; DORIGHELLO, 2017). As colônias de *B. subtilis* apresentam características morfológicas muito variadas, principalmente por causa da composição do meio de cultura de crescimento. Normalmente, as colônias apresentam coloração creme ou marrom, são opacas, de forma redonda ou irregular (JACOBSEN; LARROW 2004). O tipo de biossurfactante mais comumente observado em diferentes cepas de *B. subtilis*, tanto das cepas produzidas em laboratório quanto das cepas selvagens, são lipopetídeos cíclicos denominados de surfactinas, inturinas e fengicinas (KASPAR; NEUBAUER; GIMPEL 2019).

Esse gênero específico de bactéria, *B. subtilis*, destaca-se por possuir capacidade natural para secretar antibiótico (bacitracina) e biossurfactante (surfactina) que são compostos de alto valor biotecnológico agregado (JOSHI; BHARUCHA; DESAI, 2008). Esses microrganismos podem metabolizar diferentes substratos orgânicos, inclusive macromoléculas como amido, pectina e caseína, face à capacidade de sintetizar e secretar hidrolases (SANTIAGO, 2019). A escolha do *B. subtilis* para este estudo foi pela boa adaptação a uma ampla faixa de temperatura razoável (25 a 38 °C) e pH (2 a 9,3) (LARINI *et. al.*, 2017), o que facilitou a adaptação ao meio, bem como a disponibilidade da cepa ofertada, gentilmente, pela UFBA.

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), todos os microrganismos requerem uma fonte de carbono; os quimio-heterotróficos, como o *B. subtilis*, utilizam uma molécula orgânica advindo a exemplo da glicose ou de cadeias mais longas de ácidos graxos. Substratos que contenham fontes de carbono (glicose, manitol e sacarose) são recomendados para produção de surfactina por *B. subtilis*. O nitrogênio orgânico contido na ureia ou em extrato de carne e extrato de levedura ou inorgânico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) compõe outros micronutrientes que serão adicionados ao substrato (LARINI *et. al.*, 2017).

### 2.3 Substratos para produção de biossurfactantes

O tipo de substrato e a sua concentração são determinantes na síntese de biossurfactantes podendo tanto alterar as quantidades produzidas quanto modificá-los estruturalmente. As fontes de carbono e nitrogênio podem ser de origem hidrofílicas (como a glicose, lactose, entre outros) ou hidrofóbicas (como óleo de soja, hexadecano, entre outros). Fontes de nitrogênio podem ser advindas de nitrato de amônia, nitrato de sódio ou cloreto de amônia (DANGE et. al., 2020; PURWASENA; ASTUTI; UTAMI, 2020; SHATILA et. al., 2020). O quadro 4 elenca os estudos para produção de biossurfactantes, relacionando: o autor, o microrganismo utilizado, o meio de cultura (substrato) e o tipo de biossurfactante produzido.

Quadro 4 - Estudo da produção de biossurfactantes por microrganismos em diferentes substratos

| REFERÊNCIA                       | MICROORGANISMO                             | SUBSTRATO                                 | BIOSURFACTANTE             |
|----------------------------------|--|---|----------------------------|
| HWANG; CUTRIGH 2002              | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Pireno e fenantreno                       | Raminolípido               |
| IJAH, 1988                       | <i>Acinobacter sp</i>                      | Óleo Cru(C20-C28)                         | Glicolípido                |
| WU; JU, 1998                     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Hxadecano (limitação de nitrogênio)       | Raminolípido               |
| DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999       | <i>Bacillus subtilis</i>                   | Limitação de N2                           | Surfactina                 |
| FOX; BALA, 2000                  | <i>Bacillus subtilis</i>                   | Amido                                     | Surfactina                 |
| KIM, et. al. 2000                | <i>Bacillus subtilis</i>                   | Óleo residual                             | Surfactina                 |
| BARATHI; VASUDEVAN, 2001         | <i>Pseudomonas fluorescens</i>             | Óleo cru, querosene, hexadecano ou hexano | *                          |
| HUY, et. al. 1999                | <i>Pseudomonas sp. Acinetobacter sp.</i>   | Óleo cru, alcanos, alcenos                | Glicolípido polissacarídio |
| KIM, et. al. 2000                | <i>Nocardia sp L-417</i>                   | Hexadecano                                | *                          |
| BICCA; FLECK; AYUB, 1999         | <i>Rhodococcus ruber e R. erythropolis</i> | Diesel 1%                                 | *                          |
| COSTA; NITSCHKE, CONTIERO, 2008. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Óleo, gordura e borra vegetal             | Raminolípido               |
| BUENO, 2014                      | <i>Bacillus subtilis</i>                   | Farelo de trigo                           | Surfactina                 |
| PORTO; SANTOS; SARUBBO, 2013     | <i>Streptomyces sp.</i>                    | Óleos vegetais residual                   | *                          |
| ALMEIDA, 2011                    | <i>Pseudomonas sp.</i>                     | Óleo de linhaça, canola e glicose         | Raminolípido               |
| ANTUNES et. al., 2013            | <i>Chromobacterium violaceum</i>           | Óleo de milho (pós fritura)               | *                          |
| BEZERRA, 2012                    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Manipueira                                | Raminose                   |
| CORREA, et. al., 2014            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Milhocina e borra de óleo vegetal         | *                          |
| COSTA, 2010                      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Manipueira e óleo de fritura              | Raminolípideos             |
| FARIA, 2010                      | <i>Bacillus subtilis</i>                   | Glicerina residual                        | Lipopeptídeo Surfactina    |
| LUNA, et. al. 2011               | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Óleo de soja residual                     | Raminose                   |
| PIRÓLLO, 2006                    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | Borra de petróleo                         | Raminolípideos             |
| SOARES, 2014                     | <i>Bacillus subtilis</i>                   | Suco de caju                              | Lipopeptídeo Surfactina    |

\* não-identificado

Fonte: adaptado de (Colla e Costa, 2007)

Conforme mostrado no quadro 4 há diversos resíduos agroindustriais que podem ser aproveitados como substrato no processo fermentativo para produção de biossurfactantes. Uma das vantagens dos biossurfactantes frente aos surfactantes sintéticos é justamente a possibilidade de produção utilizando substratos alternativos. Neste caso, os resíduos agroindustriais permitem a diminuição dos custos associados à produção, tornando os biossurfactantes, potencialmente, mais viáveis em termos econômicos. A utilização de resíduos agroindustriais é ambientalmente correta, visto que auxilia na solução de entraves associados a destinação e tratamento desses resíduos (BRUMANO; SOLER; SILVA, 2016).

O Brasil tem buscado oportunidades na utilização de substratos, originados em resíduos agroindustriais, mais acessíveis para o desenvolvimento de biossurfactantes. Aqui será elencado os principais e com maior disponibilidade no país. A manipueira é o líquido extraído da mandioca quando ela é prensada no processo de fabricação da farinha. Tanto a mandioca quanto esse líquido contêm ácido cianídrico, venenoso e nocivo à alimentação humana e animal. Para que a manipueira deixe de ser potencialmente tóxica e se transforme em um complemento alimentar seguro, é necessário submetê-la à fermentação anaeróbica, ou seja, deixar o líquido repousar durante 15 dias em um tanque. O ácido cianídrico, considerado tóxico, evapora e resta a manipueira pronta para servir de complemento alimentar para o gado. A manipueira não é só um ótimo complemento alimentar para o gado.

Ela serve também para combater pragas e doenças, controlar formigas e insetos e até fabricar vinagre e sabão. Misturada com óleo de mamona, ela pode ser usada também no controle de carrapatos. Como adubo orgânico, a diluição da manipueira depende da cultura e da forma a ser aplicada, que tanto pode ser no solo quanto na folhagem (BEZERRA, 2012). A manipueira apresenta-se como potencial fonte de carbono devido conter açúcares.

Outro importante e abundante resíduo agroindustrial no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar (BCA), devido a cultura extensiva da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e etanol como combustível (MARCELINO *et. al.*, 2019). Para uso do bagaço de cana-de-açúcar em um processo fermentativo é necessário fazer alguns tratamentos iniciais. O primeiro passo é a secagem para reduzir a umidade média de 50% para abaixo de 5%, circulando ar a 60 °C durante 72 h. Em seguida o bagaço é processado em moinho de facas e peneirado até passar por peneiras com malhas de 1,1 e 2,5 mm, onde são feitas separações granulométricas (MORAIS, 2010). Finalizando esta etapa com uma pré-lavagem e filtragem para remover resíduos de terra, cinzas e principalmente açúcar residual e outros glicídios hidrossolúveis de baixa massa molar (PITARELO, 2007).

Antes da fermentação semissólida é necessário fazer as etapas de moagem deste resíduo para aumentar superfície de contato e de pré tratamentos para liberação da celulose e hidrólise da mesma, encarecendo a etapa da fermentação (SILVA, 2015). A presença de hemicelulose e lignina forma uma estrutura que envolve as cadeias de celulose do BCA, dificultando o acesso de reagentes e catalisadores, sendo necessário um pré tratamento para a remoção destes componentes, facilitando o acesso das enzimas à celulose (SILVA, 2015).

Para liberação da celulose inserida nas fibras recalcitrantes do BCA, é necessário um pré-tratamento, que pode ser ácido ou com vapor saturado. No pré-tratamento ácido utiliza-se ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 7,0 e 9,0%, submetidos a 1 atmosfera e 121 °C. No pré-tratamento a vapor, chamado de explosão a vapor, há atuação tanto química como fisicamente na estrutura do material lignocelulósico por estar baseado no contato direto da biomassa com vapor saturado a alta pressão por um determinado tempo de exposição no reator, seguido de descompressão rápida à condição atmosférica (explosão). Ao longo deste processo, as ligações da lignina e da hemicelulose, que asseguram a coesão da biomassa, são fragilizadas e em parte quebradas, de forma que, no momento da descompressão, o material é desfibrado com facilidade e assim reduzido a partículas menores, aumentando a área superficial de contato e diminuindo a resistência da parede celular à sacarificação (SILVA, 2015).

Em geral, no tratamento de explosão à vapor, a biomassa é aquecida por alguns minutos, através do contato com vapor saturado, com pressão entre 0,69 a 4,83 MPa e temperatura entre 160 a 260 °C (ZHENG *et. al.*, 2014), fazendo que o vapor saturado penetre no material. Este sistema pressurizado sofre, posteriormente, uma descompressão súbita, causando a ruptura da estrutura rígida das fibras da biomassa (STELTE, 2013).

Importante destacar que o bagaço de cana-de-açúcar, apesar de ser um resíduo agroindustrial com potencial para servir de substrato, além da limitação informada anteriormente, este resíduo, atualmente, tem um uso bem específico nas usinas de álcool e açúcar, sendo utilizado nas caldeiras para queima e consequente geração de vapor e energia elétrica (SILVA, 2015). Neste caso é um resíduo que já apresenta uma finalidade específica e um valor de mercado o que pode inviabilizar seu uso como substrato de baixo custo para produção de biossurfactante.

O melaço de cana-de-açúcar é um xarope produzido a partir da evaporação do caldo de cana ou durante a produção de rapadura, e tem forte poder adoçante. Assim como o bagaço de cana-de-açúcar, o uso do melaço como substrato também requer pré-tratamento. O pré-tratamento mais adequado para clarificação do melaço é o realizado com 8% de carvão ativo por 1 hora sob agitação a 90 °C, seguido de centrifugações, filtração em membrana de acetato

de celulose de 0,8 a 0,2  $\mu\text{m}$ . Em seguida, a solução de melação com o carvão é resfriada e filtrada a vácuo, com filtro de 120 mm. Finalmente, para retirar totalmente os resíduos de carvão utiliza-se o método de ultrafiltração por membrana (MARIM, 2014).

O melação tem alto valor comercial e utilização específica. O melação de cana é um adoçante natural que pode ser utilizado para substituir o açúcar, trazendo mais vantagens, especialmente por conter mais nutrientes como magnésio e ferro. Também utilizado na agricultura como poderoso fertilizante e adubo natural. Isso porque o produto é fonte de diversos elementos químicos essenciais para a fertilidade do solo, como cálcio, fósforo, potássio, magnésio e proteínas (MARIM, 2014).

Óleos vegetais são produtos naturais formados principalmente por triglicerídeos e são utilizados principalmente na culinária e na produção de biocombustíveis. Há uma grande utilização dos óleos vegetais na fritura de alimentos por imersão, sendo gerado consequentemente um grande volume de óleo residual. O Brasil produz, aproximadamente, quatro bilhões de litros de óleo de fritura por ano (ABIOVE, 2020). O óleo residual de fritura pode ser utilizado para produzir diferentes compostos, como: sabão, cola, tinta, massa de vidraceiro e biodiesel (SILVEIRA; VIEIRA, 2015). No entanto, no processo de fritura as propriedades térmicas e físico-químicas do óleo vegetal são alteradas afetando a perda de ácidos graxos poli-insaturados. Estes ácidos graxos são a fonte de carbono necessária para a fermentação para a produção do biossurfactantes (CARVALHO, 2013).

### 2.3.1 A borra oleosa

Segundo o boletim estatístico da ABIOVE (2020), o Brasil produziu na safra de 2020 127.989 MM de toneladas de soja em grão, e cerca de 9,6 MM de toneladas de óleo de soja, que é o óleo mais produzido no Brasil e representa 80% total da produção de óleo vegetal, seguido pelo de algodão, com representatividade de 10% do total (CONAB, 2020). A borra oleosa originada no resíduo do refino do óleo vegetal é cerca de 8% em peso do óleo produzido, ou seja, foi gerada cerca de 768 mil toneladas desta borra, referente a produção de óleo de soja em 2020 (ABIOVE, 2020).

Em Nitschke (*et. al.*, 2005) foram utilizados como substrato o sabão de óleo de soja, que é o resíduo do refino do óleo de soja, gerando 11,7 g L<sup>-1</sup> de ramnolipídeos com tensão superficial de 26,9 mN m<sup>-1</sup>. Em Correa (*et. al.*, 2014), utilizando mesmo substrato, resultou em uma tensão superficial de 25,8 mN m<sup>-1</sup> e uma extração de 20,9 g L<sup>-1</sup> de biossurfactante. Este sabão ou sabonete de soja é formado por ácidos graxos, que são removidos por centrifugação

contínua, na fase de refino do óleo vegetal, é denominado de borra (RAMALHO; SUAREZ, 2012).

A combinação da borra do óleo de soja e algodão deriva um substrato rico em ácidos graxos de cadeias longas de carbono, que propiciam um bom meio de cultura para microrganismos. Oitenta por cento destes ácidos graxos são compostos de cadeias de 16 e 18 carbonos, conforme a Tabela 1 (RAMALHO; SUAREZ, 2012).

Tabela 1 - Faixa de composição de ácidos graxos do óleo de algodão e soja

| ÁCIDOS GRAXOS      | ESTRUTURA | ÓLEO DE ALGODÃO:<br>VALORES DE<br>REFERÊNCIA (%) | ÓLEO DE SOJA:<br>VALORES DE<br>REFERÊNCIA (%) |
|--------------------|-----------|--|---|
| Ácido Palmítico    | C16:0     | 17,0 - 31,0                                      | 7,0 - 14,0                                    |
| Ácido Palmitoleico | C16:1     | 0,5 - 2,0  | < 0,5   |
| Ácido Esteárico    | C18:0     | 1,0 - 4,0  | 1,4 - 5,5                                     |
| Ácido Oleico       | C18:1     | 13,0 - 44,0                                      | 19,0 - 30,0                                   |
| Ácido Linoleico    | C18:2     | 33,0 - 59,0                                      | 44,0 - 62,0                                   |
| Ácido Linolênico   | C18:3     | 0,1 - 2,1  | 4,0 - 11,0                                    |

Fonte: adaptado de Ramalho e Suarez (2012).

## 2.4 Tipos de análises para detecção de biossurfactantes

As análises se dividem em qualitativas e quantitativas. Nas análises qualitativas se detectam a presença do biossurfactante, sem, no entanto, quantificá-los. Neste caso temos: o teste de colapso da gota; o teste de Índice de Emulsificação 24 horas (IE24) e a Espectroscopia do InfraVermelho com Transformada de Fourier (EIVTF). O teste qualitativo do colapso da gota para detecção da produção de um biossurfactante foi adaptado da metodologia de Youssef (*et. al.*, 2014).

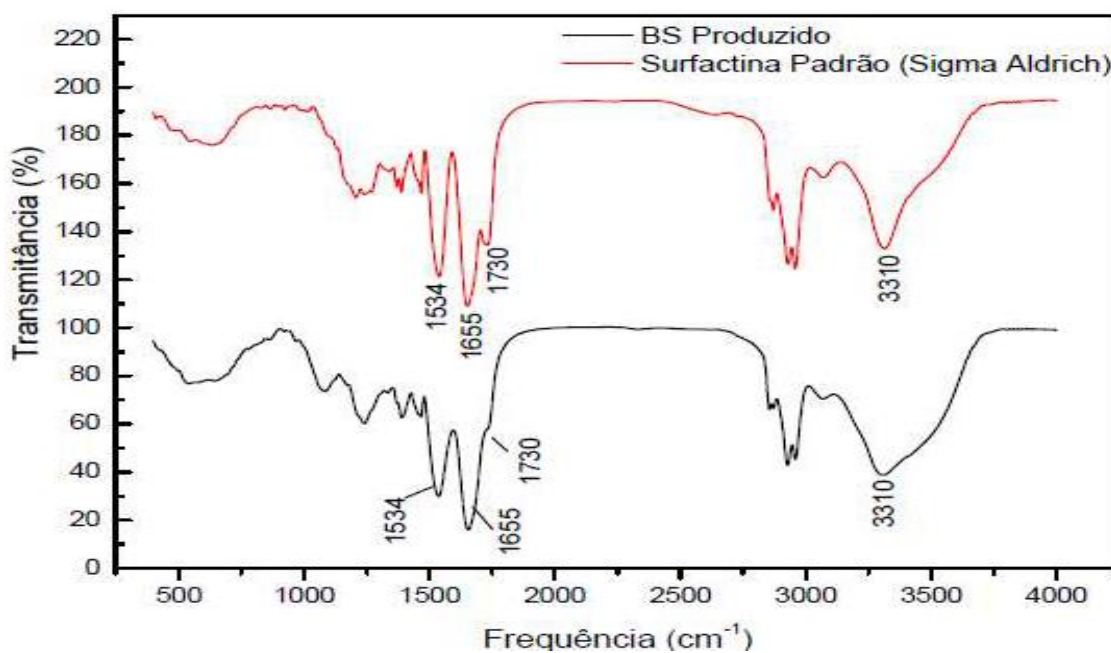
O teste de Índice de Emulsificação 24 horas (IE24), chamado desta forma, pois faz-se uma emulsão com agitação vigorosa do biossurfactante com um solvente e aguarda, em repouso, por 24 horas para fazer a leitura (ROCHA, 2017). Quando comparado com o resultado de outras amostras deste teste, pode indicar uma forma preliminar, quantitativa, sem precisão.

Outra análise qualitativa é a Espectroscopia do InfraVermelho com Transformada de Fourier (EIVTF). Maroldi (2015) compara os espectros de uma amostra padrão de surfactina com a amostra produzida pelo *B. subtilis* cultivado em meio mineral a 30 °C. Os espectros de EIVTF obtidos para o biossurfactante produzido pelo *B. subtilis* e padrão de surfactina são mostrados paralelamente. Segundo Maroldi (2015), baseado em Soares, (2014), os grupamentos base para a identificação da surfactina, através da análise de espectro obtido por

EIVTF são os seguintes, com respectivos comprimentos de onda em  $\text{cm}^{-1}$ : componentes peptídicos NH 3310; CO 1655; CN 1534 e carbonil éster 1730.

A título de exemplo a figura 2 mostra a leitura do EIVTF do trabalho de Soares, (2014) onde os picos sob a frequência 1534  $\text{cm}^{-1}$  e 1655  $\text{cm}^{-1}$  (grupos CO e CN) ficam evidenciados. Já o pico de frequência de onda de 1730  $\text{cm}^{-1}$  (grupo carbonil éster) não pôde ser observado como o apresentado pelo padrão de surfactina, mas apresenta-se na forma de um pequeno “ombro”. Ambos os espectros mostraram a formação típica, bem visualizada de componentes peptídicos em 3310  $\text{cm}^{-1}$  (grupo N-H modo alongado), (SEO *et. al.*, 2017). A semelhança entre os dois espectros confirma que o biosurfactante produzido por *B. subtilis* tem uma estrutura e grupos funcionais semelhantes ao padrão surfactina da Sigma Aldrich.

Figura 2 - Espectogramas vibracionais obtidos por EIVTF Sigma Padrão e amostra dialisada e liofilizada, excretada por *B. subtilis*.



Fonte: (SOARES, 2014)

Para análise quantitativa da concentração da surfactina a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método de separação eficaz de componentes químicos em solução. Algumas características da cromatografia líquida de alta eficiência são: emprega uma fase móvel líquida; emprega uma fase estacionária finamente dividida; opera em pressões elevadas obtendo um bom fluxo da fase móvel, garantindo um alto desempenho (SOUSA *et. al.*, 2014).

## 2.5 Análise da viabilidade econômica da unidade industrial de surfactina

A discussão da viabilidade econômica é feita antes da implantação de uma planta química industrial. O entendimento do processo químico para o desenvolvimento de uma planta industrial passa pela simulação dos fenômenos associados e pela escolha dos equipamentos. No entanto as rotas podem não se mostrar atrativas para investimento, uma vez que o custo de implantação e operação pode exceder o retorno financeiro dentro de um prazo estipulado (SANTOS; PESSOA; CALIXTOS, 2022). Além disso, existem inúmeros fatores que influenciam neste aspecto, e a análise preliminar de equipamentos custos, matérias-primas, valor do produto, entre outros, torna-se fundamental para tomada de decisão. Como resultado, é necessário estar atento ao comportamento dos parâmetros financeiros como valor presente, taxa interna de retorno e período de retorno e o fluxo de caixa de uma planta, todos baseados sobre o investimento total (PERLINGEIRO, 2018).

Em se tratando de um processo fermentativo, a produção de surfactina através do *B. subtilis*, pode ser simulada através de uma planta a batelada ou a fluxo contínuo. Esta decisão será baseada na disponibilidade de matéria prima, potencial demanda do mercado e tecnologia a ser implementada. Com o auxílio dos indicadores de investimentos permite-se determinar qual a rota tecnológica, entre várias, é a mais indicada, economicamente, na síntese de um produto. As premissas envolvidas giram diretamente em torno dos equipamentos necessários para a planta já que o investimento total tem sua maior porcentagem oriunda da obtenção dos equipamentos, que são as despesas de capital, o CAPEX (SANTANA; BISPO; PESSOA, 2021). Dessa maneira, são obtidos os índices de rentabilidade do processo químico em estudo a partir do desenvolvimento de software com banco de dados de equipamentos para cálculo de índices de rentabilidade para viabilidade econômica (SANTOS; PESSOA; CALIXTOS, 2022).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

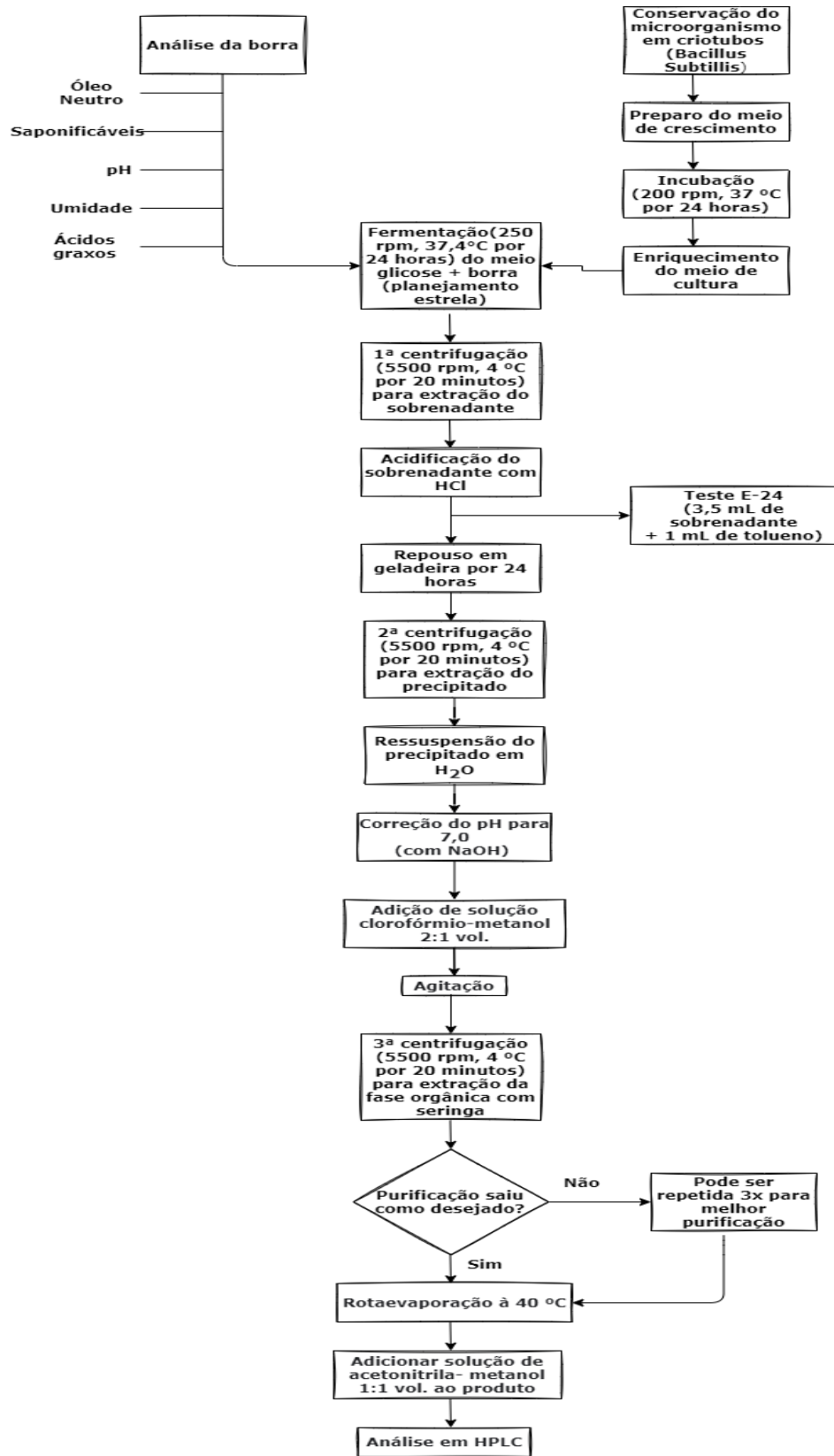
A Metodologia foi dividida em quatro etapas: a primeira envolveu a caracterização da borra oleosa. A segunda etapa trata da inoculação do *B. subtilis*, para produzir surfactina, utilizando como substrato uma mistura de glicose e borra caracterizada na 1ª etapa, acrescida de micronutrientes e avaliação do potencial de produção de biosurfactante em diferentes concentrações da borra oleosa e glicose. A terceira etapa envolveu a análise do biosurfactante produzido e a quarta etapa a simulação dos custos para produção da surfactina.

Na segunda etapa da metodologia, a qual envolveu a inoculação do *B. subtilis* no substrato e posterior fermentação foram fixas as seguintes variáveis no processo fermentativo: pH, entre 6,5 e 6,8; temperatura ajustada para 37,4 °C; velocidade de agitação de 250 rpm e razão de aeração em 0,4. Estes fatores foram baseados nos experimentos de Rocha (2017), que conseguiu uma otimização produzindo a surfactina, em nível laboratorial, na concentração de 200 mgL<sup>-1</sup>.

Na composição de borra e glicose do substrato, foi utilizado o planejamento experimental estrela, sendo elaborado 6 experimentos em duplicata, até alcançar o grupo do planejamento estrela mais otimizado, detectado através de testes de Índice de Emulsificação em 24 horas (IE24), o qual o par de composição com maior resultado do teste IE24 foi analisado via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Todos os resultados dos 6 experimentos estão planilhados no apêndice 1. A descrição da indústria e do resíduo deste estudo foi detalhado na metodologia, nos itens 3.1 e 3.2.

A figura 3 retrata um fluxograma de blocos informando as etapas da metodologia, incluindo: análise da borra oleosa; fermentação e purificação da surfactina; análise da surfactina e da viabilidade econômica.

Figura 3 - Fluxograma da metodologia



Fonte: autoria própria (2021).

### 3.1 Descrição da empresa geradora do resíduo borra oleosa

A empresa que forneceu a borra oleosa está situada na cidade de Feira de Santana-BA e, atualmente, faz o refino do óleo bruto de soja e algodão. São produzidas cerca de 120 toneladas de óleo, diariamente, gerando 8% de borra em massa, aproximadamente, 10 toneladas por dia. Em visita a empresa foi explicado o processo produtivo do refino da mistura do óleo bruto de algodão e soja, na proporção de 1:1, em massa.

A borra tem a origem no resíduo do refino de uma mistura, na proporção em massa de 1:1 de óleo de soja e de algodão. Este processo consiste no aquecimento do óleo bruto da temperatura ambiente (27 °C), até 50 °C, em trocador de calor tipo casco tubo, de 1 passe, sendo que o vapor passa pelo casco e o óleo bruto pelos tubos. Após o aquecimento foi feita uma mistura com a soda cáustica diluída, em concentração previamente preparada, que varia entre 10 a 20%, dependendo da acidez do óleo. O óleo bruto aquecido e a soda cáustica foram misturados em um misturador de linha e seguem para a torre de contato (figura 4), onde ocorre a reação de neutralização dos ácidos graxos livres. Após esta torre de contato, o óleo neutralizado e os resíduos foram aquecidos a 75 °C e seguiram para primeira centrifugação. Nesta centrífuga a borra, sai pela parte superior (figura 5).

Figura 4 - Torre de contato utilizada na neutralização do óleo



Fonte: autoria própria (2018).

Figura 5 - Saída da borra da centrífuga



Fonte: autoria própria (2018).

A borra sai da centrífuga a uma temperatura de 70 °C, variando de uma cor castanho claro a castanho escuro, dependendo da acidez inicial do óleo bruto, que varia entre 1% a 3%. Espera-se que esta borra seja composta por triglicerídeos, material saponificável, sais de ácidos graxos, fosfatídeos não hidratáveis, água e sais de sódio (FRÉ; RECH 2013; JUN, 2016). Em análises feitas pela empresa, a média de ácido graxo total desta borra foi de 39% e umidade de 37,5%. A mesma apresentou forma pastosa na temperatura ambiente, com odor ativo e na cor escura. Não foi realizada nenhuma outra análise adicional desta borra pela empresa.

Na visita foram fornecidos dados da produção do mês de maio de 2018, da análise do percentual de ácidos graxos total e o percentual de umidade da borra, coletada na parte superior da centrífuga (figura 6). Ao final da visita ao setor de produção foram coletadas duas amostras do mesmo local da coleta acima e enviada para análises químicas no Laboratório Integrado de Pesquisa Aplicada em Química (LIPAQ) do Centro Universitário SENAI CIMATEC.

Figura 6 - Ponto de coleta da borra para análise



Fonte: autoria própria (2018).

Em temperatura ambiente (26 a 28 °C), a borra apresenta aspecto pastoso, conforme figura 7.

Figura 7 - Aspecto da borra coletada para análise químicas à temperatura ambiente



Fonte: autoria própria (2018).

### 3.2 Análises químicas para caracterização da borra

Para as análises físico-químicas da borra oleosa, de forma a caracterizá-la com a possibilidade de ser utilizada como meio de cultivo para bactérias para produção de biossurfactantes, foi utilizado o trabalho de Santos (2012) como referência, conforme métodos descritos na *American Oil Chemists' Society* (2019).

Com base nesta referência foram feitas seguintes análises: determinação de óleo neutro; determinação do pH; determinação do teor de resíduos saponificáveis; umidade. Para

determinação do ácido graxo total foi utilizada a cromatografia a gás, empregando método adaptado de Volkmann, Jenske e Kremer (2017).

### 3.2.1 Determinação do óleo neutro

A borra de óleo foi homogeneizada com 60 mL de solução de etanol 50% e 25 mL de éter de petróleo em agitador com barra magnética. Em seguida, foram adicionados 60 mL de água destilada e, posteriormente, 50 mL de éter etílico. Após ocorrer a separação de fases, a fase superior (éter de petróleo e óleo) foi mantida e a fase inferior (aquosa) foi transferida para outro funil de separação e feito nova extração desta fase aquosa, conforme método descrito neste parágrafo, de forma a garantir toda extração do óleo desta fase aquosa.

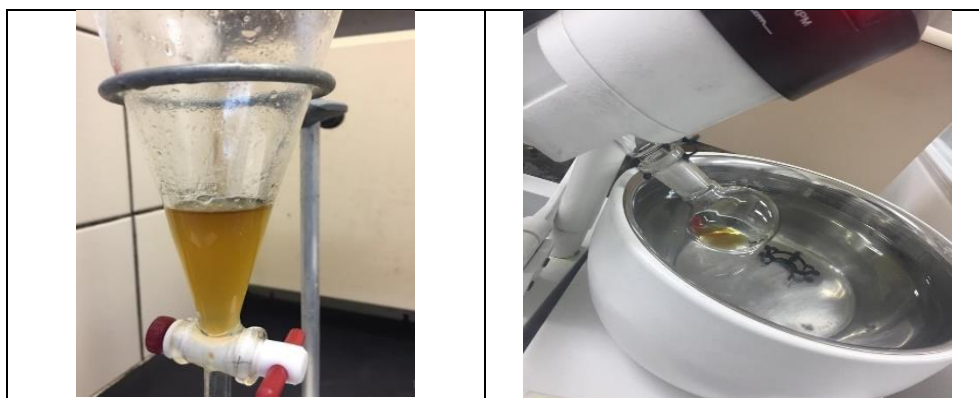
As fases superiores foram acondicionadas em um mesmo funil e lavadas com 50 mL de água destilada até obtenção do pH neutro. Em seguida, foi feita a filtração com papel de filtro e sulfato de sódio anidro. O filtrado foi recolhido em balão de fundo chato previamente pesado. O balão foi levado ao rotoevaporador a 25 °C até evaporar todo o solvente (figura 8). Um mililitro de acetona foi adicionado ao óleo no balão e a secagem foi feita a temperatura ambiente. Em seguida, o balão contendo somente óleo foi pesado.

O cálculo para determinação do óleo neutro foi realizado segundo a Equação a seguir:

$$\text{Óleo neutro (\%)} = \text{massa do óleo (g)} / \text{massa da amostra (g)} \times 100$$

Onde: massa do óleo = valor obtido pela diferença da massa do balão, contendo o óleo, e a massa do balão vazio; e massa da amostra = massa inicial da amostra de borra.

Figura 8 - Determinação do óleo neutro



Fonte: autoria própria (2019).

### 3.2.2 Determinação do pH

Nesta análise foi determinada a alcalinidade das borras através da medida do pH da fase aquosa. Aproximadamente 20 g de borra foi pesada e homogeneizada com 20 mL de água destilada, em seguida mediu-se o pH utilizando-se pHmetro da marca Bel Engineering W3B.

### 3.2.3 Determinação do teor de resíduos saponificáveis

A análise do teor de resíduos de saponificáveis foi determinada pesando uma alíquota de 0,4 g de borra, que foi homogeneizada com 60 mL de água destilada e 1 mL de azul de bromotimol. A amostra foi titulada com HCl 0,1 N, previamente padronizado, até viragem de azul para amarelo. O cálculo foi realizado segundo a Equação:

$$\text{Resíduos saponificáveis (ppm)} = V * N * 304 * 1000 / m$$

Onde: V= volume (mL) de ácido titulado, N= normalidade do HCl 0,1 N,  
304 = peso molecular médio do ácido oleico e outros ácidos graxos e  
m = massa da amostra (g).

### 3.2.4 Análise de umidade

A análise de umidade foi realizada segundo o método de Karl Fisher, utilizando o aparelho Karl Fisher. Aproximadamente 0,1 g de amostra foi dissolvida em solvente (30 mL da solução metanol: clorofórmio, na proporção 2:1).

$$\text{Umidade \%} = (\text{massa inicial (g)} - \text{massa final (g)}) \times 100 / \text{massa inicial}$$

### 3.2.5 Análise de ácidos graxos

Como os ácidos graxos são os mais importantes constituintes do substrato, fez-se necessário a utilização da cromatografia a gás para identificar e quantificar os ácidos graxos na borra analisada. Seguindo o método adaptado de Volkmann, Jenske e Kremer (2017), os ésteres de ácidos graxos foram analisados em um cromatógrafo a gás com detector espectrométrico de

massas do laboratório do LIPAQ, modelo GCMS – QP2010SE, GC-2010 Plus, fabricante: Shimadzu, utilizando uma coluna capilar HP – 05 MS (NST) CB (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m).

O fluxo do gás de arraste (hélio 5.0) utilizado foi de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. A rampa de aquecimento da coluna foi programada para iniciar a 60 °C durante 1 minuto. Em seguida, a temperatura foi elevada para 210 °C a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto. Por fim, a temperatura foi elevada até 300 °C a uma taxa de 5 °C min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e detector foram de 260 °C e 280 °C, respectivamente. Foram injetados 1 $\mu$ L das amostras esterificadas.

O método de detecção utilizado foi o SIM (monitoramento de íons selecionado), que permite que o espectrômetro de massa detecte compostos com sensibilidade muito alta. A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos. Por estar diluído a 1 ppm, as áreas encontradas foram pequenas. A identificação dos analitos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos presentes nas amostras com os de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos FAME CRM 18.918, da marca Supelco Analytical Products - Sigma Aldrich, EUA.

### **3.3 Produção da surfactina por *Bacillus Subtilis***

A cepa que foi testada para crescimento e produção de biosurfactante em substrato oleaginoso foi a do *B. Subtilis* CCT 0089, com número de registro na ATCC 6633, (NIH, 2022), gentilmente cedida pela UFBA.

#### **3.3.1 Preparo do inóculo**

A fonte de nitrogênio, presente na peptona animal e nos extratos de carne e levedura são essenciais para composição do substrato. A formulação do meio de crescimento está baseada em Santiago (2019). A cepa do *B. subtilis* CCT 0089 estava armazenada em 60 crio tubos, conservados a temperatura abaixo de 0 °C.

Os reagentes utilizados foram: peptona animal; extrato de carne; extrato de levedura; cloreto de sódio; água destilada; 4 crio tubos com *B. subtilis* CCT 0089. Foram usados os seguintes equipamentos e utensílios em condições de meio estéril: balança digital; cabine de fluxo laminar; incubadora da marca Tecnal com range de temperatura de 10 °C a 80 °C e com ajuste de agitação de 0 a 300 rpm; espátulas; vidradrias e filtros. Inicialmente pesou-se os materiais em maior quantidade (peptona e cloreto), segundo o quadro 5:



Quadro 5 - Peso dos reagentes para preparo do meio de crescimento

| REAGENTE            | PESO (g) |
|---------------------|----------|
| Peptona Animal      | 50,07    |
| Extrato de Carne    | 15,06    |
| Extrato de Levedura | 15,12    |
| Cloreto de Sódio    | 50,37    |

Fonte: adaptado de Fernandes (*et. al.*, 2007)

Todos os reagentes foram transferidos para o Erlenmeyer de 1000 mL e dissolvidos em de água destilada, avolumados para 1000 mL e a solução foi levada para a autoclave junto com os materiais que iriam ser utilizados na inoculação. Após ser feita a assepsia da cabine de fluxo laminar, os materiais autoclavados foram transferidos para a mesma e ficaram expostos à luz UV por 15 minutos. Para a inoculação, foi transferido 125 mL de meio de crescimento para cada um dos 8 Erlenmeyers de 250 mL, e então o conteúdo dos criotubos foram distribuídos com proporções visualmente iguais em cada um (1/2 criotubo para cada Erlenmeyer). Todos foram levados para a incubadora com temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e rotação de 200 rpm, por 24 horas.

### 3.3.2 Enriquecimento do substrato e crescimento do *B. subtilis* no meio borra / glicose

Para o enriquecimento do substrato, que fez parte do meio de cultivo, juntamente com o inóculo, foram adicionados macros, micronutrientes e indutores, de forma que tenha uma melhor eficiência de produção do biossurfactante. Os elementos-traço  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  são particularmente importantes na biossíntese de surfactina por *B. subtilis* por atuarem como cofatores principais em sistemas multienzimáticos envolvidos nesse processo (CHEN; JUANG; WEI 2015).

Para este processo foram preparadas as soluções: meio basal e a solução estoque, detalhadas na tabela 2, utilizando seguintes reagentes: fosfato de potássio; sulfato de amônio; sulfato de magnésio heptahidratado; EDTA; sulfato de manganês hidratado; sulfato de ferro heptahidratado; cloreto de cálcio; cloreto de cobalto hexahidratado; sulfato de zinco heptahidratado; hidróxido de sódio; solução tampão pH 4.0; solução tampão pH 7 e água destilada.

Os reagentes para o meio basal e a solução estoque foram pesados e diluídos em diferentes quantidades, como mostra a tabela 2:

Tabela 2 - Quantidades dos reagentes utilizados para preparo do meio basal e solução estoque

| REAGENTE                           | MASSA (g) | VOLUME DE ÁGUA (mL) | TIPO DE SOLUÇÃO |
|------------------------------------|-----------|---------------------|-----------------|
| Fosfato de Potássio                | 1,00      | 400                 | Meio basal      |
| Sulfato de Amônio                  | 0,40      | 400                 | Meio basal      |
| Sulfato de Magnésio Heptahidratado | 0,20      | 400                 | Meio basal      |
| EDTA                               | 0,01      | 100                 | Solução Estoque |
| Sulfato de Mangânes Hidratado      | 0,30      | 100                 | Solução Estoque |
| Sulfato de Ferro Heptahidratado    | 0,01      | 100                 | Solução Estoque |
| Cloreto de Cálcio                  | 0,01      | 100                 | Solução Estoque |
| Cloreto de Cobalto Hexahidratado   | 0,01      | 100                 | Solução Estoque |
| Sulfato de Zinco Heptahidratado    | 0,01      | 100                 | Solução Estoque |

Fonte: (ROCHA, 2017; FARIA, 2010).

Após o preparo das duas soluções, foi feita a correção do pH da solução estoque com cerca de 1 ml de solução de hidróxido de sódio (2M) (8% p/v), estabilizando o pH em 7.0. Alguns fatores básicos são importantes para otimização da produção da surfactina. Em Rocha (2017) o experimento que obteve a maior concentração de surfactina 200 mg/L, foi utilizando os seguintes fatores: pH, entre 6,5 e 6,8; temperatura ajustada para 37,4 °C; velocidade de agitação de 250 rpm e razão de aeração em 0,4. Estes fatores foram fixados e repetidos nos experimentos a seguir.

### 3.3.3 Combinação das Fontes de Carbono

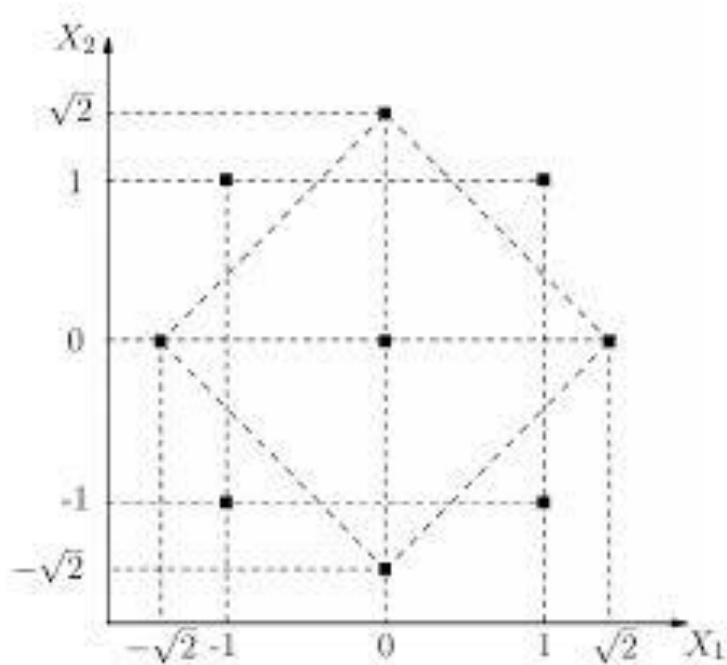
Os triglicérides, contidos na borra oleosa, são um natural indutor do *B. subtilis* para produção da surfactina (SENA *et. al.*, 2018). Porém, o *Bacillus subtilis*, requer uma fonte de energia de mais fácil absorção, como a glicose, para promover sua multiplicação inicial. O *B. subtilis* cataboliza a glicose através da via glicolítica, responsável por quebrar as moléculas de glicose, liberando energia para promover a sua multiplicação (CHEN; JUANG; WEI, 2015). A fonte de carbono contido nos ácidos graxos da borra oleosa, é consumida em seguida à glicose.

Deste modo, este estudo desenvolveu condição otimizada de percentual de borra e glicose, que produzisse a maior concentração de surfactina, mantendo inalterado as outras

variáveis no experimento, tais como: pH, temperatura e aeração. Para obter condição mais otimizada de percentual de borra e glicose, foi utilizado o planejamento experimental estrela composto central, (figura 9) que balizam 8 pontos de experimento, formando a estrela e três repetições do ponto central, chamado de pontos neutros.

Foram elaborados 6 experimentos em duplicata, até alcançar o grupo do planejamento estrela mais otimizado, (experimento 6), detectado através de testes de Índice de Emulsificação em 24 horas (IE24). O par de composição borra glicose com maior resultado do teste IE24 foi analisado via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todos os resultados dos 6 experimentos estão planilhados no Apêndice 1.

Figura 9 - Planejamento experimental estrela



Fonte: (PEREIRA, POPPI, ARRUDA, 2002).

Conforme metodologia aplicada em Santos, Simões e Silva (2011) foi aplicado o planejamento experimental estrela, que resultou, neste trabalho, na combinação otimizada das fontes de carbono em diferentes proporções, em massa, de glicose (0,17%, 1%, 3%, 5% e 5,83%) e de borra oleosa na proporção em massa de 1:1 de óleo de soja e de algodão (0,34%, 2%, 6%, 10% e 11,65%), (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação dos parâmetros codificados de glicose e borra (% massa)

| X                  | (-√2) | (-1) | (0) | (1) | (+√2)  | Equação    |
|--------------------|-------|------|-----|-----|--------|------------|
| <b>Glicose(f1)</b> | 0,17% | 1%   | 3%  | 5%  | 5,83%  | (f1)=2*X+3 |
| <b>Borra (f2)</b>  | 0,34% | 2%   | 6%  | 10% | 11,65% | (f2)=4*X+6 |

Fonte: Autoria própria (2022)

Com os dados da Tabela 3 e as informações apresentadas no gráfico 1, foi traçado os 11 pontos do ensaio do planejamento estrela mostrado na Tabela 4, convertido os percentuais respectivos de glicose e borra, em peso. Nesta mesma tabela, foi acrescentado um ponto de controle em branco, ou seja, sem a presença de borra e apenas com 5 % de glicose, (ensaio 12), independente dos pontos do planejamento estrela, para obter o resultado de produção da surfactina na ausência da borra.

Tabela 4 - Matriz do planejamento composto central das variaáveis borra e glicose com valor (g)

| Ensaio | Glicose (g) | Borra (g)  |
|--------|-------------|------------|
| 1      | -1 (0,77)   | -1 (1,54)  |
| 2      | 1 (3,85)    | -1 (1,54)  |
| 3      | -1 (0,77)   | 1 (7,70)   |
| 4      | 1 (3,85)    | 1 (7,70)   |
| 5      | 0 (2,31)    | 0 (4,62)   |
| 6      | 0 (2,31)    | 0 (4,62)   |
| 7      | 0 (2,31)    | 0 (4,62)   |
| 8      | -√2 (0,15)  | 0 (4,62)   |
| 9      | 0 (2,31)    | -√2 (0,30) |
| 10     | +√2 (4,49)  | 0 (4,62)   |
| 11     | 0 (2,31)    | +√2 (8,93) |
| 12     | (3,85)      | (0,0)      |

Fonte: Autoria própria (2022)

As diferentes quantidades de borra e de glicose, conforme as duas últimas colunas da tabela 5, foram pesados, diretamente, nos Erlenmeyers. Após todos os Erlenmeyers estarem com as suas devidas alíquotas de borra e glicose, foi adicionado em cada um a seguinte quantidade de cada solução preparada anteriormente: 20 mL de meio basal e 5 mL da solução estoque. Após a adição das soluções foi medido o pH de cada Erlenmeyer e corrigido para 7,0 quando necessário. Todos os materiais foram levados para a esterilização em autoclave, e

transferidos para a cabine de fluxo laminar, para a transferência dos inóculos incubados no meio de crescimento para o substrato meio/borra enriquecido.

Inicialmente todo o meio de crescimento, preparado no item 3.3.1, foi realocado no béquer de 1000 mL para um melhor manuseio. Com auxílio de uma proveta o meio de crescimento foi distribuído, equitativamente, 80 mL em cada um dos erlenmeyers, previamente esterilizados, contendo quantidades diferentes de borra e glicose, somados à solução basal.

Em seguida, os Erlenmeyers foram levados para a incubadora, para o processo de fermentação. As condições para a fermentação dos 12 ensaios foram: período de incubação de 24 horas, temperatura de 37,4 °C, pH 6,8 e rotação de 200 rpm com razão de aeração 0,4 definida como a razão do volume do meio de cultivo e volume do frasco (ROCHA, 2017). Estas condições foram mantidas inalteradas por serem condições ideais para fermentação do *B. subtilis*, conforme Shaligram e Singhal (2010).

Após o processo fermentativo, o produto foi recolhido em frascos shots devidamente numerados e armazenados na geladeira.

#### 3.3.4 Cinética de crescimento

Ao longo do processo fermentativo foi necessário monitorar três principais fatores: consumo do substrato; crescimento da biomassa e produção do fermentado (surfactina). O método para quantificar a biomassa seca e determinação da concentração do substrato está descrito em Bezerra (2012). Para monitorar a cinética de crescimento, adaptado de Rocha, (2017), foram coletadas amostras nos tempos de: 0, 4, 8, 12 16 e 24 horas para análise quantitativa da biomassa seca, substrato e surfactina.

Após os tempos indicados, foram retiradas as alíquotas do fermentado e centrifugado, sendo analisadas: a absorbância da suspensão para o cálculo do substrato e pesado o sedimentado para cálculo da biomassa seca. Este peso da biomassa seca foi obtido transferindo o sedimentado com água destilada, para placas de Petri pré-pesadas e secas em estufa a vácuo a 45 °C até peso constante (BEZERRA, 2012). Para o produto surfactina foi feito uma medição indireta dos pontos intermediários, entre 4 e 20h, utilizando o teste de índice de emulsificação (IE24). Para o tempo de 24h, além do teste de índice de emulsificação (IE24), foi utilizado análise cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência.

As velocidades instantâneas de transformação “r” foram definidas pelas seguintes velocidades: de crescimento de micro-organismos ( $r_x$ )= $d_x/t$ , de consumo de substrato ( $r_s$ )= $-d_s/t$ , de formação de produto ( $r_p$ )= $d_p/t$  (HISS, 2001). A produtividade em produto  $P_p$  é representada

pela concentração volumétrica do produto ( $P_t$ ) no tempo de cultivo  $t$ , menos a concentração do produto no início do cultivo ( $P_o$ ) (HISS, 2001). A produtividade da biomassa  $P_x$  é representada pela concentração da biomassa seca ( $X_t$ ) no tempo de cultivo  $t$ , menos a concentração da biomassa seca no início do cultivo ( $X_o$ ).

O fator de conversão de biomassa em produto é determinado pela seguinte equação:

$$Y_{p/x} = (P_t - P_o) / (X_t - X_o) \quad (\text{HISS, 2001})$$

Onde:

$P_t$  = concentração do produto em tempo de cultivo  $t$

$P_o$  = concentração do produto no início do cultivo

$X_t$  = concentração da biomassa seca no tempo de cultivo  $t$

$X_o$  = concentração da biomassa seca no início do cultivo

Foram calculados os fatores de conversão, conforme equações, que possibilitam medir o rendimento da fermentação conforme Hiss, (2001).

- **Fator de conversão de substrato em biomassa:**

$$Y_{x/s} = (X_t - X_0) / (S_0 - S_t)$$

Onde  $Y_{x/s}$  = fator de conversão de substrato em biomassa (g de biomassa seca obtida por g de substrato consumido),  $X$  = concentração de biomassa seca ( $g\ l^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $X_0$  = concentração de biomassa seca ( $g\ l^{-1}$ ) no início do cultivo,  $S_0$  = concentração de substrato ( $g\ l^{-1}$ ) no início do cultivo e  $S$  = concentração do substrato ( $g\ l^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo.

- **Fator de conversão de biomassa em produto:**

$$Y_{p/x} = (P_t - P_0) / (X_t - X_0)$$

Onde  $Y_{p/x}$  = fator de conversão de biomassa em produto (g de biomassa seca por mg de produto obtido),  $P$  = concentração de produto ( $mg\ l^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $P_0$  = concentração de produto ( $mg\ l^{-1}$ ) no início do cultivo,  $X_0$  = concentração de biomassa seca ( $g\ l^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo e  $X_0$  = concentração de biomassa seca ( $g\ l^{-1}$ ) no início do cultivo.

- **Fator de conversão de substrato em produto:**

$$Y_{p/s} = (P_t - P_0) / (S_0 - S_t)$$

Onde  $Y_{p/s}$  = fator de conversão de substrato em produto (g de substrato por mg de produto obtido),  $P$  = concentração de produto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $P_0$  = concentração de produto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no início do cultivo,  $S_0$  = concentração de substrato ( $\text{g L}^{-1}$ ) no início do cultivo e  $S$  = concentração do substrato ( $\text{g L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo.

Para o cálculo da produtividade em produto, que representa a velocidade média de formação de produto pelo tempo de cultivo.

$$P_p = (P_t - P_0) / t_f$$

Onde  $P_p$  = produtividade do produto ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).  $P_t$  = concentração volumétrica de produto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no tempo  $t$  de cultivo,  $P_0$  = concentração volumétrica de produto ( $\text{mg L}^{-1}$ ) no início do cultivo e  $t_f$  = tempo de cultivo (h). O rendimento do produto é expresso pela quantidade de surfactina produzida (mg) pelo volume total do meio de crescimento e solução basal (L) (GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011).

### **3.4 Purificação e caracterização do biossurfactante**

As etapas a seguir detalham todo o processo de purificação feito para purificação do surfactante. Conforme o fluxograma da Figura 3, a recuperação do biossurfactante, (extração da surfactina) foi desenvolvida em 4 etapas:

1. Primeira centrifugação com recolhimento do sobrenadante;
2. Segunda centrifugação;
3. Extração líquido-líquido com terceira centrifugação;
4. Rotaevaporação e Ressuspensão (BUENO, 2010; ROCHA, 2017).

### 3.4.1 Primeira centrifugação com recolhimento do sobrenadante

Para a primeira centrifugação, com recolhimento do sobrenadante, foram utilizados seguintes reagentes: caldos fermentados; ácido clorídrico 3M (HCl) e água destilada. A centrifugação foi feita na centrífuga refrigerada Sigma 3-18KS com rotação máxima de 30.000 rpm e força G de 30.000 g.

Para centrifugação dos caldos fermentados foram dispostos em tubos Falcon cerca de 40 mL de cada um dos meios borra/glicose enriquecidos, que em seguida foram pesados e avolumados para possuírem pesos semelhantes, favorecendo assim o balanceamento da centrífuga. Após a pesagem, os tubos foram separados e centrifugados em grupos, numa centrífuga refrigerada a 4° C, com velocidade de 5500 rpm por 15 minutos.

Após a centrifugação, o precipitado que continha *Bacillus sp.* e outros resíduos foram descartados, sendo recolhido em tubos Falcon de 50 mL, a maior quantidade possível (cerca de 30 ml) do sobrenadante, livre de células. Em seguida o pH foi corrigido para 2,0, utilizando diferentes alíquotas de HCl 3M.

Para o teste de índice de emulsificação em 24h (IE24), foram utilizados 3,5 ml de cada tubo, deste sobrenadante, após acidificado, e separado à parte para este teste, que está descrito no item 3.4.2.2. Após a correção do pH, as amostras foram deixadas em repouso “overnight” no refrigerador a 4 °C.

Foi observado que, após a fermentação, houve um decréscimo do pH dos meios que continham mais glicose do que borra. A borra apresentou um pH de 9,3, o que decorre que os meios com maior quantidade de borra o pH estava próximo de 7,0, enquanto os meios com maior quantidade de glicose o pH estava ácido.

### 3.4.2 Segunda Centrifugação

Para a realização da segunda centrifugação, os sobrenadantes acidificados, após a primeira centrifugação, foram pesados e separados em grupos para um melhor balanceamento da centrífuga no processo de centrifugação na mesma centrífuga Sigma 3-18KS refrigerada a 4 °C, a 2500 rpm<sup>1</sup> por 15 minutos.

---

<sup>1</sup> Utilizando a velocidade de 2500 rpm, o precipitado ficou suspenso no sobrenadante, então uma terceira centrifugação foi feita, com um aumento na velocidade para 5500 rpm, onde houve resultados mais satisfatórios.



Posteriormente à centrifugação, foi feita a ressuspensão dos precipitados em 5 ml de água destilada, e a correção do pH com a solução de NaOH 1M. Após a correção do pH, as amostras foram armazenadas na geladeira até a realização dos testes seguintes.

### 3.4.3 Extração Líquido-Líquido e Terceira Centrifugação

Para a realização da extração líquido-líquido e terceira centrifugação foi, inicialmente, preparada a solução clorofórmio-metanol (2:1 v/v) na capela de exaustão onde foi medido 40 ml de clorofórmio e 20 ml de metanol. Em seguida, os dois volumes foram transferidos para o Erlenmeyer de 250 ml.

Para a extração líquido-líquido, após o preparo da solução clorofórmio-metanol (2:1 v/v), foram adicionados 5 ml desta solução em cada um dos tubos contendo o precipitado neutralizado. A solução de cada tubo foi levada para o agitador de vórtex por 1 minuto.

#### **Terceira centrifugação**

Em seguida, os tubos foram pesados e separados em grupos para manter o balanceamento da centrífuga. Durante o processo de centrifugação a 2.500 rpm a 4 °C por 10 minutos houve separação de fases: orgânica na fase inferior e aquosa na fase superior, que foi descartada (ROCHA, 2017).

### 3.4.4 Rotaevaporação e Ressuspensão

Após a terceira centrifugação, a fase orgânica (fase inferior), foi retirada, totalmente, com uma seringa de 10 ml e transferida para tubos de vidro com tampa, e armazenadas na geladeira (ROCHA, 2017).

A fase orgânica contendo surfactina foi levado ao rotaevaporador Buchi V-850 para ser concentrado a temperatura de 40 °C. Após esta etapa, o produto foi ressuspensionado com 5,0 ml de acrilonitrila-metanol (1:1, v/v) para análise qualitativa por infravermelho e análise quantitativa utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, (CLAE).

### 3.5 Análises qualitativas para detecção do biossurfactante

Foram feitos três tipos de análises qualitativas para identificar a presença do biossurfactante surfactina: teste de colapso da gota; Índice de Emulsificação em 24 horas (IE24) e Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (EIVTF).

As alíquotas para o teste de colapso da gota e para o Índice de Emulsificação em 24 horas (IE24), foram retiradas do sobrenadante do caldo fermentado acidificado, livres de células, após a 1ª centrifugação. Para a análise qualitativa da Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (EIVTF), foram retiradas as alíquotas das amostras do produto final purificado.

#### 3.5.1 Teste de colapso da gota

O teste qualitativo do colapso da gota para detecção da produção da surfactina foi realizado em tampas de microplacas de 96 poços. Os poços das tampas foram untados com 2 ml de óleo de motor 10 W-40 e deixados em repouso por 24 h. Após este período, 0,5 ml dos sobrenadantes das culturas foram colocados em cada um dos poços e o colapso da gota avaliado após 2 minutos. O resultado seria considerado positivo quando fosse observado, visualmente, a gota colapsada (YOUSSEF *et. al.*, 2004). Contudo, este resultado visual qualitativo não foi percebido. Deste modo foi feita uma adaptação para este teste utilizando placas de Petri.

Os materiais e equipamentos utilizados nesta etapa foram: óleo de motor; surfactante industrial; sobrenadante da primeira centrifugação, acidificado, além das 11 placas de Petri pequenas e utensílios: pipetadores e ponteiras.

Cada placa foi untada com cerca de 2 ml de óleo de motor, e posteriormente com ajuda do pipetador, foi adicionado 3 ml do sobrenadante de cada tubo nas placas de Petri, observando, visualmente, se houve a quebra da tensão superficial do óleo.

#### 3.5.2 Índice de Emulsificação em 24 horas (IE24)

Este ensaio é considerado uma análise qualitativa, porém o índice de emulsificação em 24 horas (IE24) indica um resultado comparativo. Foi realizado em tubos de ensaio com tampa

de rosca pela adição de 2,0 ml de tolueno a 3,5 ml do sobrenadante, misturando em agitador de tubo por 2 min. e deixado em repouso por 24 horas (ROCHA, 2017). O índice foi calculado como porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido (cm) (BUENO (2010); WEI; WANG; CHANG, (2004)). Foram usados o sobrenadante da primeira centrifugação e tolueno, além dos tubos Falcon e agitador de tubo.

Este teste foi feito após a acidificação do sobrenadante da primeira centrifugação: na capela de exaustão, foi pipetado 3,5 mL do sobrenadante centrifugado e acidificado, em tubos de vidro, e adicionado mais 1,0 mL de tolueno. Cada tubo foi agitado em um agitador de tubos por 2 minutos e deixado em repouso por 24 horas, para a leitura do IE24. Foram feitos os testes para os 11 pares de borra e glicose, o teste em branco, sem presença da borra e o teste da surfactina industrial para os 6 grupos de experimentos rodados em duplicata. Todos os resultados estão no Apêndice 1 desta Tese.

### **3.6 Análise por infravermelho das amostras de surfactina**

A Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (EIVTF) foi baseado em Janek (*et. al.* 2021), onde comparou-se os espectros de uma amostra padrão de surfactina com as amostras produzidas pelo *B. subtilis*. Esta análise demonstra, de forma qualitativa, as ligações químicas, características, presentes na surfactina, como o grupo carbonila.

A presente análise foi feita em Portugal, no espectrômetro modelo FTIR DW-FTIR-530 da marca Drawell, na Universidade de Évora. Para efeito comparativo da análise foram escolhidas as 3 amostras de maior concentração de surfactina, a 3, 5 e 6, a de menor concentração (amostra 1) e uma de concentração intermediária, a amostra 10. Estas amostras foram previamente analisadas, no Laboratório de Análises Químicas do Centro Universitário SENAI CIMATEC, via cromatografia líquida de alta eficiência, para obter suas concentrações.

#### **3.6.1 Análise Quantitativa para determinação da surfactina utilizando CLAE-DAD.**

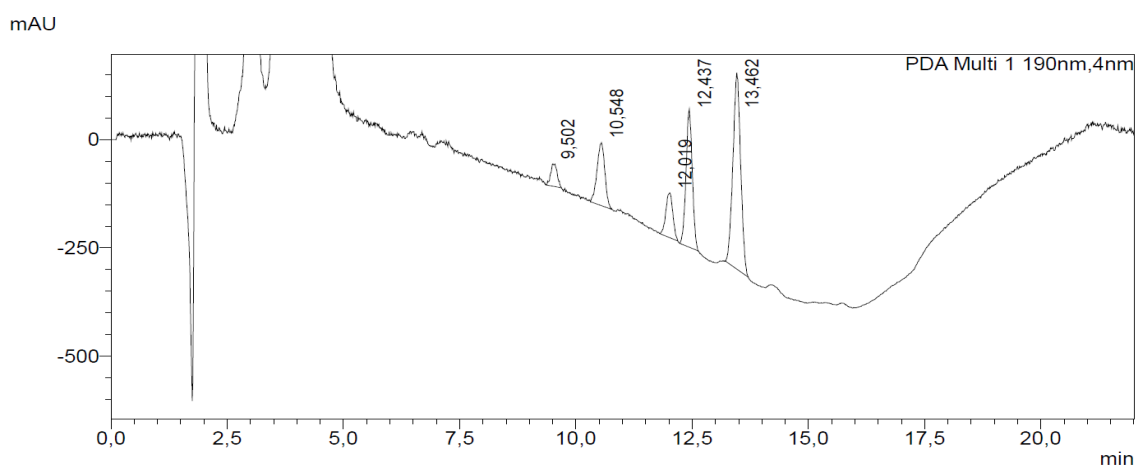
Posteriormente a ressuspensão do extrato com 5,0 mL de acrilonitrila:metanol (1:1, v/v), as amostras foram colocadas em vials, previamente filtrada com filtro PTFE, 0,2  $\mu$ , 13mm e, disponibilizadas para a análise cromatográfica. A análise para identificação e quantificação da surfactina nas amostras foi feita por meio da adaptação do método descrito por Wei, (2004). A concentração da surfactina foi determinada utilizando um cromatógrafo líquido de alta

eficiência (Shimadzu Co. 20A, Japão), equipado com detector de arranjo de diodos SPD-M20A, operando a 190nm.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa Restek Roc C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). A composição da fase móvel foi de 20% de ácido fórmico (0,2%) e 80% de acetonitrila de forma isocrática. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL.min<sup>-1</sup>, a temperatura do forno da coluna setada para 28°C e o volume de injeção das amostras foi de 20  $\mu$ L. O tempo total das corridas foi de 22 minutos.

A identificação da surfactina nas amostras analisadas foi realizada por meio da comparação entre os tempos de retenção obtidos pela injeção de solução-padrão de surfactina diluída em acetonitrila:metanol (1:1, v/v) e os tempos de retenção dos picos das isoformas da surfactina obtidos nas amostras. Foram obtidos cinco picos cromatográficos com a solução-padrão de surfactina, os quais corresponderam às cinco isoformas desta substância. Os tempos de retenção dos picos das isoformas, referentes à solução-padrão foram de 9,502; 10,548; 12,019; 12,437 e 13,462 minutos, (Gráfico 1).

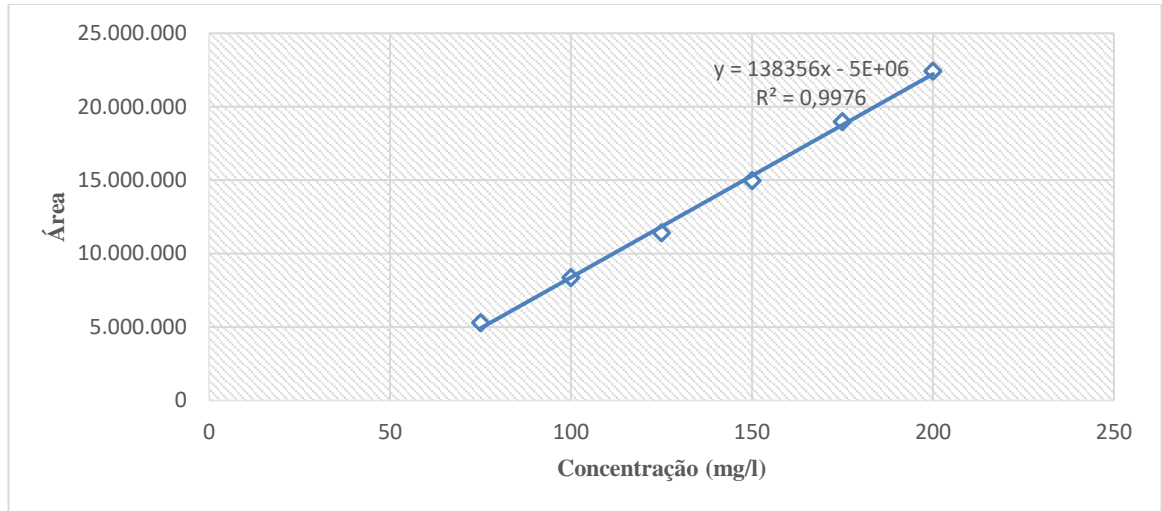
Gráfico 1 - Cromatograma, obtido por CLAE-DAD, da solução padrão de surfactina (125 mg l<sup>-1</sup>), contendo a identificação dos picos cromatográficos das cinco isoformas do analito



Fonte: autoria própria (2022).

Para a quantificação foi utilizado um padrão analítico da surfactina (Sigma-Aldrich), com pureza de 95%. Uma curva analítica foi construída, como mostra o gráfico 2, por meio de diluições sucessivas da solução-padrão de surfactina, em metanol, sendo consideradas as seguintes concentrações: 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mg l<sup>-1</sup>. A construção da curva analítica foi realizada pela soma das médias das áreas dos picos das cinco isoformas presentes na solução-padrão. O limite de detecção (LD), calculado para esta curva, foi de 11 mg l<sup>-1</sup> e o limite de quantificação (LQ) de 36 mg l<sup>-1</sup>.

Gráfico 2 - Curva analítica obtida para a quantificação da surfactina presente nas amostras 1 a 12 do experimento 6.



Fonte: autoria própria (2022).

### 3.7 Análise viabilidade econômica

Para esta análise de viabilidade econômica foi considerado os seguintes parâmetros:

- Planta de fermentação tipo: batelada (processo descontínuo);
- Volume total do reator: 50 m<sup>3</sup>;
- Capacidade de fermentação (52% do volume do reator): 26 m<sup>3</sup>/dia com taxa de aeração de 48%;
- Massa de borra utilizada: 1.386 kg /dia o que corresponde a 14% da borra gerada, diariamente, pela empresa localizada em Feira de Santana-BA, conforme descrito no item 3.1 desta tese;

Com base nestes parâmetros foi escalonado, do nível laboratorial para industrial, no valor de 300.000 vezes. Este escalonamento da quantidade de matéria prima e reagentes está representado na planilha no Apêndice 2 deste trabalho, juntamente com os valores, respectivos, de cada matéria prima e reagentes, obtidos por valor de mercado em sites de compras, resultando no valor total de reagentes e matérias primas utilizados neste processo, que formam as despesas operacionais, OPEX.

Com o resultado de quantidade de matérias primas, substratos e reagentes calculados no escalonamento foi projetado os equipamentos que compõe a escala industrial, conforme o fluxograma da figura 10 e planilha do Apêndice 2 desta tese, sendo:

01 tanque de 4 m<sup>3</sup> para mistura e preparação das soluções: primeira solução, fosfato dibásico de potássio; segunda solução, sulfato de amônio com sulfato de magnésio heptahidratado e terceira solução, chamada de solução estoque.

01 reator, fermentador, de 50 m<sup>3</sup>, encamisado, com taxa de ocupação de 52% onde se processará a fermentação por 24 horas, com aeração, medição de pH e temperatura a ser mantida a 37,4 °C.

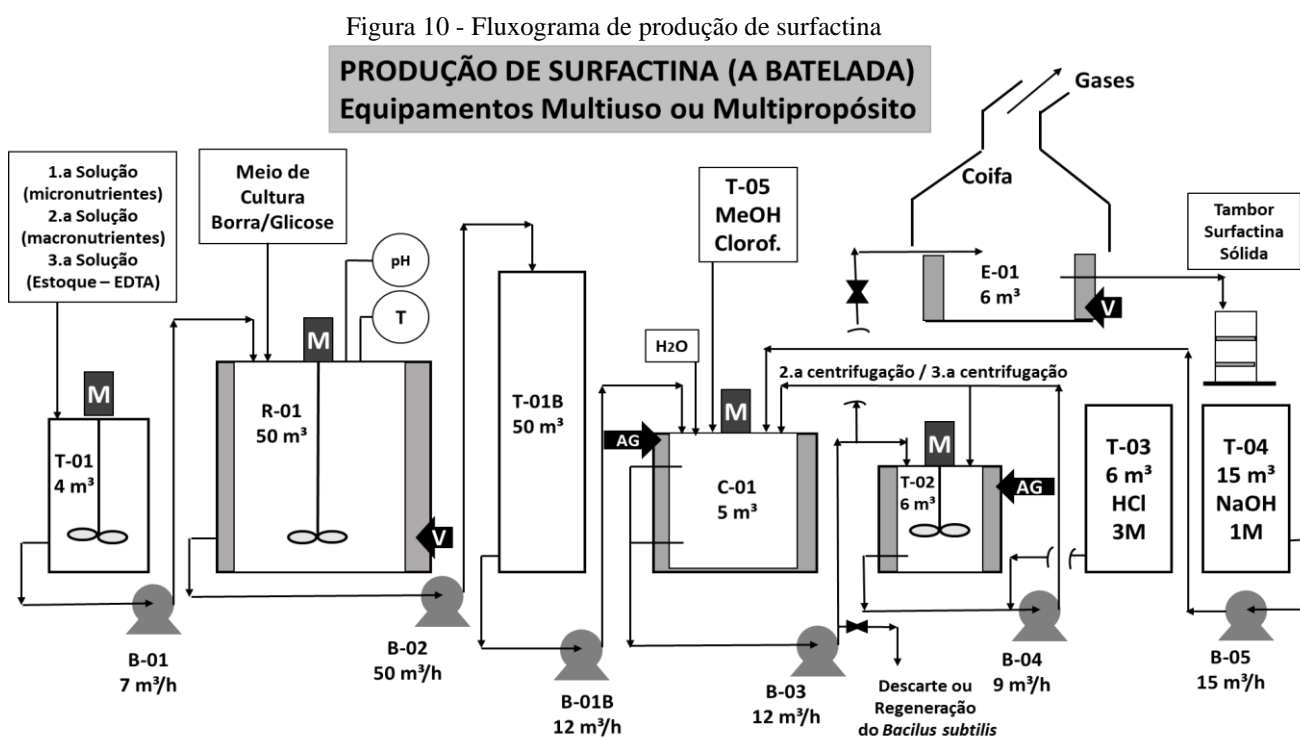
01 tanque de 50 m<sup>3</sup> para recebimento de todo o material após a fermentação; uma centrífuga multiuso de 5 m<sup>3</sup>, onde serão feitas as 3 centrifugações do processo;

01 tanque de acidificação de 6 m<sup>3</sup>; tanque para armazenamento de ácido clorídrico;

01 tanque para armazenamento de soda cáustica;

01 tanque para armazenamento e dosagem de metanol e clorofórmio; bombas;

01 evaporador com capacidade de 6 m<sup>3</sup>.



Fonte: Autoria própria (2022)

Com base nas dimensões destes equipamentos e materiais de construção dos mesmos foram calculados, utilizando os Softwares: Super Pro Designer e de Análise Econômica de Processos Químicos, este último, desenvolvido por Santos, Pessoa e Calixtos (2022) onde obteve-se os valores das despesas de capital, ou seja, o CAPEX dos equipamentos. A produção foi baseada no fator de conversão de substrato em produto, calculado no item 4.4 desta tese:

$$Y_{p/s} = (129-0)/(40,8-18,0)$$

$$Y_{p/s} = 5,66 \text{ (mg de produto obtido por g de substrato).}$$

Ou seja: foram produzidos 5,66 mg de surfactina para cada grama de borra utilizada. Por dia foi utilizado 1.386 kg de borra, gerando 7,84 kg de surfactina. O preço da surfactina produzida foi pesquisado em uma empresa produtora de surfactina na Índia: preço cotação, FOB, em Mumbai, da empresa Altinbio PV LTDA. Valor U\$\$ 3.800 / kg, base Julho 2022. A conversão utilizada da moeda foi: 1U\$\$ = R\$ 5,50. Com base na receita gerada, custos de produção (OPEX) e valor investido em equipamentos, (CAPEX), foi calculado a análise de investimentos, utilizando o software Análise Econômica de Processos Químicos, (AEPQ), e os resultados serão mostrados no capítulo 4 de resultados e discussões.

## 4 RESULTADOS

Os resultados apresentados abrangem desde as análises físico-química e cromatográfica da borra, as análises qualitativas e quantitativa da surfactina, bem como resultados da viabilidade econômica.

### 4.1 Análise da Borra

A média dos resultados de análises, realizadas pela empresa, de ácidos graxos totais e percentual de umidade em oito datas distintas, em maio de 2018, foram, respectivamente: 38,02% de ácidos graxos e 38,06% de umidade.

A seguir os resultados das análises físico-químicas da borra oleosa utilizada no experimento. Todas as análises foram feitas em triplicata. Foram analisados o percentual de óleo neutro, pH, teor de resíduos saponificáveis e % de umidade. Os resultados apresentados na Tabela 5:

Tabela 5 – Resultados das análises físico-química da borra oleosa

| PARÂMETROS  | AMOSTRA 1 | AMOSTRA 2 | AMOSTRA 3 | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---|-----------|-----------|-----------|-------|---------------|
| % de Óleo Neutro                                      | 6,44      | 6,81      | 8,13      | 7,13  | 0,89          |
| pH  | 9,29      | 9,36      | 9,35      | 9,33  | 0,10          |
| Teor de Resíduos Saponificáveis (mg.l <sup>-1</sup> ) | 33,56     | 31,50     | 31,85     | 32,30 | 1,10          |
| % Umidade   | 53,04     | 52,50     | 52,19     | 52,57 | 3,81          |

Fonte: autoria própria (2019).

O principal componente para utilização desta borra oleosa como substrato no processo fermentativo para produção da surfactina são os ácidos graxos, (resíduos saponificáveis). Como não foi encontrado na literatura dados comparativos com esta mesma borra, composta de um mix 1:1 em 50% em peso de óleo de algodão e soja, foi comparado ao resultado do trabalho de Fré e Rech (2013) no qual foi analisada uma borra oleosa de soja, sendo encontrado 27,66% de ácidos graxos. Nota-se que a borra analisada para esta tese apresentou um percentual maior, na média de 32,30% de ácidos graxos. Este valor superior apresenta uma vantagem competitiva desta borra oleosa em comparação a borra formada apenas por óleo de soja, já que os ácidos graxos são as fontes de carbono que serão consumidas pelos *B. subtilis*.

Devido a importância destes ácidos graxos no estudo foi feita uma análise via cromatografia gasosa desta borra, onde os resultados para os ésteres dos ácidos graxos



correspondentes analisados estão tabulados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da análise cromatográfica gasosa para os ésteres dos ácidos graxos presentes na borra oleosa.

| <b>Mz</b> | <b>COMPOSTO</b>           | <b>TR</b> | <b>MÉDIA ÁREAS (%)</b> | <b>DESVIO PADRÃO</b> |
|-----------|---------------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| 158       | Octanoato de Metila       | 5,827     | ND                     | 0,00                 |
| 186       | Decanoato de Metila       | 6,523     | 0,43                   | 0,06                 |
| 214       | Laurato de Metila         | 7,759     | 1,88                   | 0,19                 |
| 242       | Tetradecanoato de Metila  | 9,499     | 0,84                   | 0,02                 |
| 268       | Palmitoleato de Metila    | 12,260    | 0,44                   | 0,17                 |
| 270       | Palmitato de Metila       | 12,589    | 35,21                  | 0,06                 |
| 294       | Linoleato de Metila       | 15,864    | 45,08                  | 0,02                 |
| 292       | Linolenato de Metila      | 15,950    | 1,06                   | 0,01                 |
| 296       | Ácido cis-9-octadecenóico | 15,980    | 5,90                   | 0,08                 |
| 298       | Octadecanoato de Metila   | 16,447    | 6,67                   | 0,02                 |
| 326       | Araquidato de Metila      | 20,256    | 0,86                   | 0,32                 |
| 352       | Erucato de Metila         | 23,330    | ND                     | 0,00                 |
| 354       | Docosanoato de Metila     | 23,783    | 0,76                   | 0,01                 |
| 382       | Lignocerato de Metila     | 27,009    | 0,30                   | 0,01                 |

Mz = matriz TR = tempo de retenção ND = não detectado

Fonte: autoria própria (2019).

A Tabela 7 mostra um comparativo dos dados de literatura, obtidos de Ramalho e Suarez (2012), nas duas primeiras colunas, respectivamente, óleo de algodão e soja, com os dados da terceira coluna, que foram obtidos, neste trabalho, por cromatografia a gás. Na cromatografia a gás foram obtidos resultados para os ésteres de ácidos graxos, dentro da faixa dos valores de referência dos graxos dos óleos de algodão e soja em Ramalho e Suarez (2012), principalmente para: o ácido palmítico (cadeia C<sub>16</sub>, saturada), com maior percentual no óleo de algodão e o ácido oleico (cadeia C<sub>18</sub> simples insaturação) e o ácido linoleico (cadeia C<sub>18</sub>, dupla insaturação), presente em ambos os óleos.

Os resultados das análises físico-químicas e cromatográfica mostram que a borra é um adequado substrato para fermentação pelo *B. subtilis*, principalmente por apresentar cadeias carbônicas de 16 e 18 átomos, presentes nos ácidos graxos (LARINI *et. al.*, 2017).

Tabela 7 –Comparativo com resultado da análise cromatográfica da borra e dados da literatura

| ÁCIDOS GRAXOS      | ESTRUTURA | Óleo de algodão:<br>VALORES DE<br>REFERÊNCIA<br>(%) | Óleo de soja:<br>VALORES DE<br>REFERÊNCIA<br>(%) | Borra:<br>RESULTADOS<br>DA GC (%) |
|--------------------|-----------|---|--|-----------------------------------|
| Ácido Palmítico    | C16:0     | 17,0 - 31,0   | 7,0 - 14,0                                       | 35,2                              |
| Ácido Palmitoleico | C16:1     | 0,5 - 2,0   | < 0,5  |                                   |
| Ácido Esteárico    | C18:0     | 1,0 - 4,0   | 1,4 - 5,5  |                                   |
| Ácido Oleico       | C18:1     | 13,0 - 44,0   | 19,0 - 30,0                                      | 5,9                               |
| Ácido Linoleico    | C18:2     | 33,0 - 59,0   | 44,0 - 62,0                                      | 45,1                              |
| Ácido Linolênico   | C18:3     | 0,1 - 2,1   | 4,0 - 11,0                                       | 1,1                               |

Fonte: adaptado de Ramalho e Suarez (2012).

## 4.2 Análises qualitativas da produção de surfactina

Foram feitos três tipos de análises qualitativas para detecção da surfactina, detalhadas a seguir:

### 4.2.1 Teste de colapso da gota

O teste de colapso da gota é percebido, visualmente: com água e óleo, mantém a imiscibilidade e a tensão superficial, conforme tubo à esquerda da figura 11. Com surfactante industrial e óleo há o colapso da gota, conforme visto no tubo à direita da mesma figura.

Figura 2 - À esquerda óleo e água; à direita óleo e surfactante



Fonte: autoria própria (2018).

Nas gotas de óleo espalhadas nas 4 placas de Petri da figura 12, observou-se a quebra da tensão superficial na placa contendo surfactante comercial e da amostra 11 (quarta placa). Não houve quebra da tensão superficial na primeira placa, contendo água e da amostra 9 (segunda placa). Quando comparado a amostra 9 e 11, observou-se que a amostra 11 teve uma concentração de surfactina maior que a amostra 9, quando analisada pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Figura 12 - Teste de colapso da gota



Fonte: autoria própria (2018).

#### 4.2.2 Índice de emulsificação 24 horas (IE24)

O Índice de Emulsificação 24 horas (IE24) é uma análise qualitativa comparativa para avaliar a presença de surfactante. No entanto, quando comparado com outras amostras do mesmo experimento, pode indicar a presença comparativa quantitativa entre as mesmas, conforme a tabela 8.

O resultado apresentado na Tabela 8 refere-se a média dos resultados do experimento de número 6, rodado em duplicata. Conforme informado na metodologia todos os resultados dos outros 5 experimentos, rodados em duplicata, estão no Apêndice 1 desta Tese.

Tabela 8 - Índice de Emulsificação 24 horas: média do experimento 6, feito em duplicata

| AMOSTRAS               | ALTURA CAMA EMULSIFICADA (cm) | ALTURA TOTAL (cm) | %  |
|------------------------|-------------------------------|-------------------|----|
| 1                      | 1,1                           | 3,6               | 31 |
| 2                      | 1,4                           | 3,5               | 39 |
| 3                      | 1,3                           | 3,4               | 37 |
| 4                      | 1,3                           | 3,5               | 37 |
| 5                      | 1,5                           | 3,8               | 40 |
| 6                      | 1,5                           | 3,4               | 43 |
| 7                      | 1,5                           | 3,5               | 42 |
| 8                      | 1,5                           | 3,5               | 41 |
| 9                      | 1,2                           | 3,8               | 30 |
| 10                     | 1,3                           | 3,3               | 38 |
| 11                     | 1,2                           | 3,7               | 32 |
| Branco – sem glicose   | 1,1                           | 3,5               | 30 |
| Surfactante industrial | 1,8                           | 3,6               | 49 |

Fonte: autoria própria (2021).

O maior índice de emulsificação de amostra contendo glicose (3%) e borra (6%) ocorreu na amostra 6 (43%), comparado ao surfactante industrial, que atingiu 49% de índice de emulsificação, indicando a maior produção de surfactina na amostra 6.

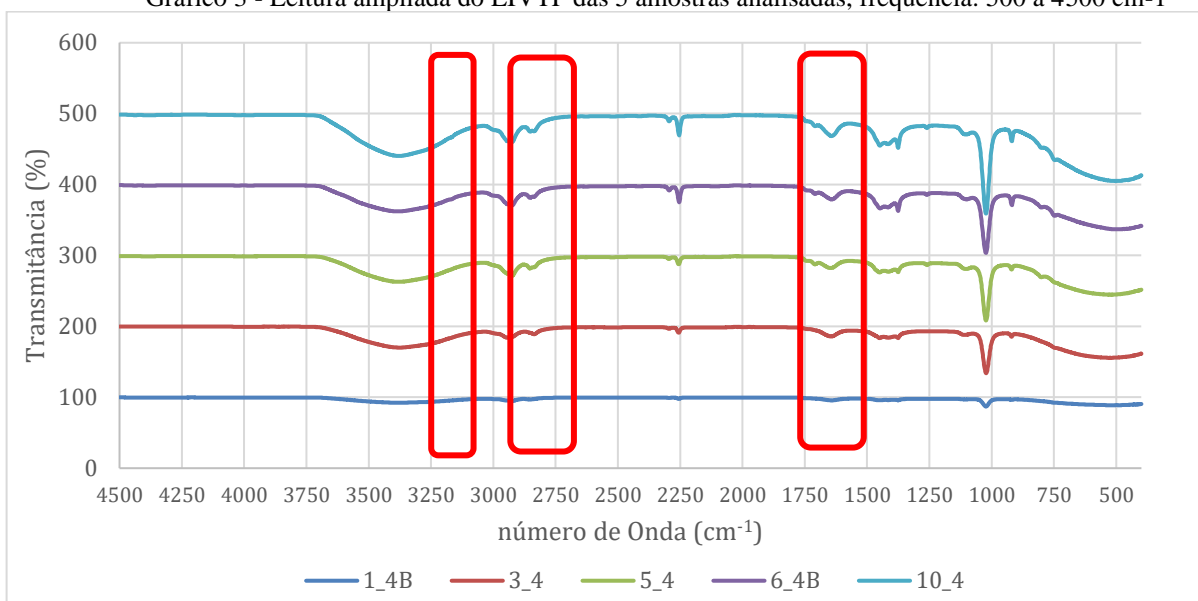
As duas seguintes amostras com maiores índices de emulsificação foram amostras: 7 (42%) e 8 (41%), contendo, respectivamente: glicose (3%) e borra (6%) e glicose (0,17%) e borra (6%). Os resultados de menores índices de emulsificação foram as amostras: 9 (30%), contendo glicose (3%) e borra (0,34%) e amostra em branco, contendo apenas glicose, 5% e 0% de borra. Estes resultados indicam que maior quantidade de borra que glicose resultam um maior percentual da camada emulsificada, indicando que há maior quantidade de surfactante.

#### 4.2.3 Resultados da Análise da Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (EIVTF)

Para efeito comparativo da análise foram escolhidas as 3 amostras com maior concentração de surfactina, a 3, 5 e 6, a de menor concentração, amostra 1, e uma de concentração intermediária, a amostra 10. Estas amostras foram previamente analisadas, via cromatografia líquida de alta eficiência.

Como a amostra está solubilizada em metanol e acrilonitrila, na análise do gráfico 3 tem-se de descontar a interferência na frequência  $1534\text{ cm}^{-1}$  da ligação O-H, presente no metanol e frequência  $1655\text{ cm}^{-1}$  da ligação C-N, presente na acrilonitrila.

Gráfico 3 - Leitura ampliada do EIVTF das 5 amostras analisadas, frequência: 500 a 4500 cm<sup>-1</sup>



Fonte: autoria própria (2022).

As bandas observadas na frequência entre 1650-1700 cm<sup>-1</sup> correspondem as bandas características ao modo da ligação CO-N, evidenciado no Gráfico 4, com a leitura ampliada do espectro. O espectro na forma de “ombro” observado na frequência entre 1735–1750 cm<sup>-1</sup> é devido a um grupo carbonila, (C=O), característica presente na surfactina (KUMAR *et. al.*, 2018). A presença de uma cadeia alifática indicada pelos modos C-H em 2840–3000 cm<sup>-1</sup> também foi observada. Os espectros mostraram componentes peptídicos em 3300-3400 cm<sup>-1</sup> (N-H modo alongado).

A amostra 6 mostrou um espectro mais evidente, confirmando que o biosurfactante produzido por *B. subtilis* cepa CCT 0089 tem uma estrutura e grupos funcionais semelhantes ao padrão surfactina apresentado na figura 2. Os espectros de EIVTF são semelhantes a outros relatados na literatura, conforme citado em Soares (2014); Maroldi (2015) e Janek (*et. al.*, 2021.)

A região corresponde ao -C-CH<sub>2</sub> e vibrações do grupo -C-CH<sub>3</sub> em cadeias alifáticas indica que a surfactina da amostra 6 produzida por *B. subtilis* cepa CCT 0089, provavelmente, contém algumas impurezas de diferentes estruturas químicas, principalmente, de origem do resíduo de borra oleosa presente na surfactina. Diante da análise realizada, pode-se dizer que há indícios de que o biosurfactante obtido pode ser a surfactina, porém são necessárias mais análises para se afirmar a veracidade deste fato, visto que pode haver a presença de interferentes como compostos aromáticos que também apresentam absorbâncias próximos a faixa de 3000

cm<sup>-1</sup>, por exemplo, monossacarídeos residuais que foram arrastados nas etapas de purificação ou ainda a existência de outros metabólitos possivelmente formados.

#### 4.3 Análise quantitativa da surfactina usando a cromatografia líquida de alta eficiência

Conforme relatado no item 3.3.3 da metodologia, evidenciado na tabela 4, os resultados de concentração de surfactina, das 11 amostras do experimento 6, analisadas, em duplicata, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados das Amostras analisadas via CLAE

| # AMOSTRA | GLICOSE (%) | BORRA (%) | CONC. (mg.l <sup>-1</sup> ) | DESVIO PADRÃO |
|-----------|-------------|-----------|-----------------------------|---------------|
| 1         | 1,00        | 2,00      | 49,15                       | 0,00          |
| 2         | 5,00        | 2,00      | 74,21                       | 1,88          |
| 3         | 1,00        | 10,00     | 128,15                      | 1,81          |
| 4         | 5,00        | 10,00     | 110,77                      | *             |
| 5         | 3,00        | 6,00      | 125,08                      | 0,99          |
| 6         | 3,00        | 6,00      | 128,52                      | 0,77          |
| 7         | 0,17        | 6,00      | 83,23                       | 0,60          |
| 8         | 3,00        | 0,34      | 41,58                       | 4,72          |
| 9         | 5,83        | 6,00      | 82,76                       | 0,75          |
| 10        | 3,00        | 11,65     | 107,48                      | *             |
| 11        | 5,00        | 0,00      | 37,69                       | 0,28          |

\*amostras 4 e 10 não teve desvio padrão, pois não foi rodado em duplicata

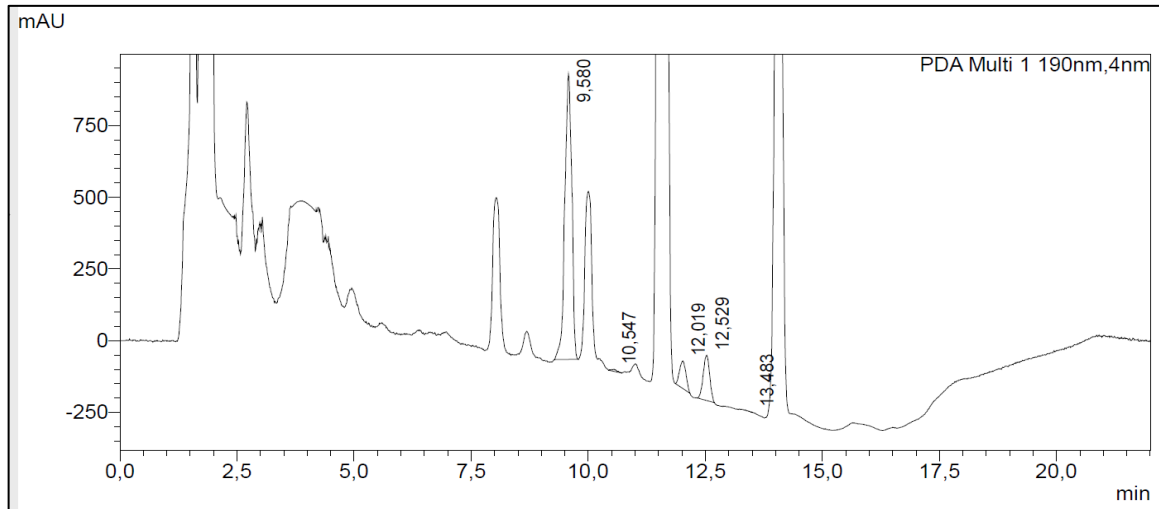
Fonte: autoria própria (2022).

Destaca-se que nos substratos contendo 3% de glicose e 6% de borra oleosa, ponto central do planejamento estrela, foi obtido a maior produção de surfactina (126,80 mg L<sup>-1</sup>), em média. Observou-se ainda que as amostras que resultaram menor concentração de surfactina foram dos substratos que tinham menor concentração de borra oleosa em relação a glicose.

A amostra 6 apresentou 5 picos nos tempos de retenção mostrados no gráfico 4, resultando em uma concentração de 128,52 mg l<sup>-1</sup>.

As outras três amostras com melhores resultados foram, na seguinte ordem decrescente: 3, 5, 4, com seguintes concentrações, respectivamente: 128,15; 125,08; 110,77 mg.L<sup>-1</sup>, todas apresentando maior percentual de borra que glicose.

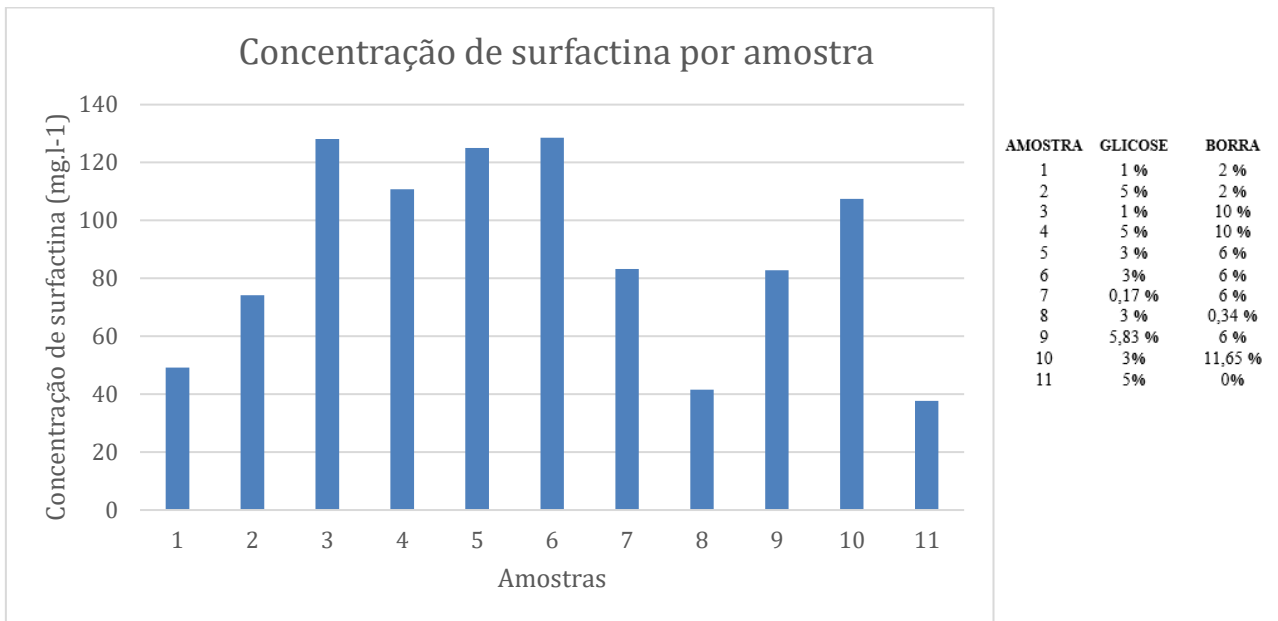
Gráfico 4 - Cromatograma da amostra 6 apresentando os picos



Fonte: autoria própria (2022).

O gráfico 5 mostra a concentração de surfactina, das 11 amostras, combinado com o percentual de borra e glicose, de cada amostra, informado na legenda.

Gráfico 5 - Comparativo da concentração de surfactina das 11 amostras



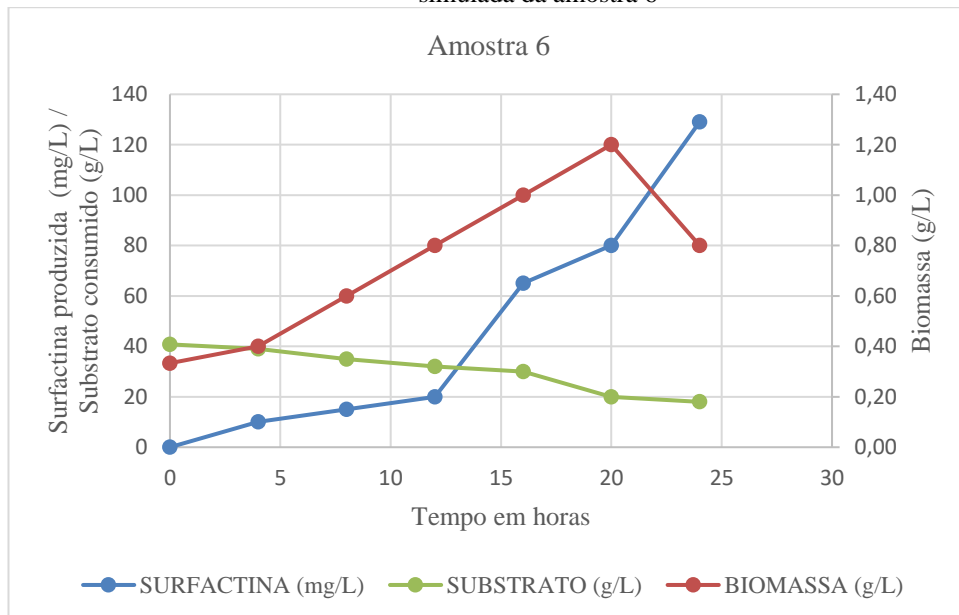
Fonte: autoria própria (2022).

#### 4.4 Fatores de conversão e rendimento da surfactina

Com os resultados de concentração de surfactina analisados, via CLAE, em que a amostra 6 apresentou o maior resultado de concentração de surfactina, foram simuladas as mesmas condições de fermentação desta amostra, para o cálculo dos fatores de conversão e rendimento, conforme o gráfico 6.

Ao final de um processo fermentativo foi esperado a redução da concentração de biomassa devido à queda de massa de substrato, sinalizando o final do processo devido à escassez do substrato.

Gráfico 6 - Curvas de crescimento da biomassa, consumo de substrato e produção de surfactina, simulada da amostra 6



Fonte: autoria própria(2022).

#### Fator de conversão de substrato em biomassa:

$$Y_{x/s} = (0,80 - 0,33)/(40,8 - 18,0)$$

$$Y_{x/s} = 0,02 \text{ (g biomassa seca obtida por g de substrato consumido)}$$

#### Fator de conversão de biomassa em produto:

$$Y_{p/x} = (129-0)/(0,80-0,33)$$

$$Y_{p/x} = 276,43 \text{ (mg de produto obtido por g de biomassa seca).}$$



**Fator de conversão de substrato em produto:**

$$Y_{p/s} = (129-0)/(40,8-18,0)$$

$$Y_{p/s} = 5,66 \text{ (mg de produto obtido por g de substrato).}$$

**A produtividade em produto:**

$$P_p = (129 - 0) / 24$$

$$P_p = 5,37 \text{ (mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{).}$$

O maior valor de concentração de surfactina obtido foi na amostra 6 foi de 128,52 mg.l<sup>-1</sup>. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho de produção de surfactina através de *B. subtilis* que utilizasse um substrato combinado da borra oleosa de soja e algodão. Deste modo, a comparação de resultados foi feita com trabalhos utilizando outros substratos, como: melação de cana-de-açúcar, melação de soja, suco de caju, que tiveram condições semelhantes de fermentação, ou seja: temperatura de 37,4 °C , pH 6,8, com rotação de 200 rpm e razão de aeração variando entre 0,4 a 0,6.

No experimento de Rocha (2017), utilizou melação de cana-de-açúcar e obteve como maior concentração de surfactina o valor 199 mg.L<sup>-1</sup>; sendo produtividade de produto, P<sub>p</sub> = 8,18 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e fator de conversão de substrato em produto de Y<sub>p/s</sub> = 0,046 g.g<sup>-1</sup>. Em Lima (2010), utilizou melação de soja, obteve-se 91 ppm de concentração de surfactina e produtividade de produto, P<sub>p</sub> = 3,79 mg.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Em Wei (2007) utilizou meio formulado com glicose, obteve 250 mg.L<sup>-1</sup> de surfactina. Oliveira (2013), utilizaram substrato de suco de caju, obtiveram concentração de 215 mg.L<sup>-1</sup> de surfactina. Makkar e Cameotra (2002), utilizou como substrato meio mineral suplementado com melação obteve surfactina na concentração de 200 mg.L<sup>-1</sup>

Quanto ao uso dos micronutrientes, estudos de Wei, Lai e Chang (2007), mostraram que Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Fe<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup> foram efetivos na produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332, com rendimento de 1,6 g.L<sup>-1</sup>. Na ausência de Mg<sup>2+</sup> ou K<sup>+</sup> e Mn<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup> o rendimento diminuiu para 0,4 g.L<sup>-1</sup> e 0,6 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Quando Fe<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup> estavam ausentes, o *B. subtilis* ATCC 21332 produziu 80% da surfactina inicial. Os resultados indicaram que a interação de Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> promoveu um aumento na produção de surfactina para 3,34 g.L<sup>-1</sup>, aproximadamente o dobro do rendimento inicial.

O fator de conversão de substrato em produto foi utilizado na simulação da análise da viabilidade econômica proposta para a planta industrial de surfactina.

#### 4.5 Análise de viabilidade econômica

Conforme metodologia descrita no item 3.7 deste trabalho: o cálculo OPEX da operação de 1 dia, foi de U\$\$ 20.783,00. O cálculo do valor gerado de receita diária foi de 7,84 kg surfactina X 3.800 U\$\$/kg = U\$\$ 29.810,00.

O CAPEX, informado na tabela 10, foi calculado, baseado no preço FOB, ano 2019, conforme descrito em Santos, Pessoa e Calixtos (2022) utilizando o software Super Pro Designer.

Tabela 10 - Cálculo do CAPEX utilizando os softwares: Super Pro Designer e de Análise Econômica de Processos Químicos

| Equipamentos                      | TAG           | Unidade              | Custo                  |
|-----------------------------------|---------------|----------------------|------------------------|
| Tanque de preparação das soluções | T-01          | 4 m <sup>3</sup>     | \$ 210.000,00          |
| Reator                            | R-01          | 50 m <sup>3</sup>    | \$ 1.428.000,00        |
| Centrífuga                        | C-01          | 5 m <sup>3</sup>     | \$ 52.728,68           |
| Tanque de reepção do fermentado   | T-01b         | 50 m <sup>3</sup>    | \$ 92.782,19           |
| Tanquede acidificação             | T-02          | 6 m <sup>3</sup>     | \$ 208.000,00          |
| Tanque de HCl                     | T-03          | 6 m <sup>3</sup>     | \$ 26.000,00           |
| Tanque de NaOH                    | T-04          | 15 m <sup>3</sup>    | \$ 6.000,00            |
| Tanque de clorofórmio e metanol   | T-05          | 2 m <sup>3</sup>     | \$ 26.000,00           |
| Bomba de preparo da solução       | B-01          | 7 m <sup>3</sup> /h  | \$ 3.224,11            |
| Bomba do reator                   | B-02          | 50 m <sup>3</sup> /h | \$ 5.565,98            |
| Bomba de NaOH                     | B-05          | 15 m <sup>3</sup> /h | \$ 3.511,46            |
| Bomba da centrífuga               | B-03          | 12 m <sup>3</sup> /h | \$ 7.737,87            |
| Bomba de HCl                      | B-04          | 9 m <sup>3</sup> /h  | \$ 6.931,38            |
| Evaporador                        | E-01          | 204 ft <sup>2</sup>  | \$142.715,28           |
|                                   | <b>TOTAL:</b> |                      | <b>\$ 2.239.196,95</b> |

Fonte: autoria própria (2022).

Considerado uma Taxa Mínima de Atratividade (TMA) de 20%; um tempo de carreira da planta de 20 anos, com prazo de retorno dos investimentos à partir do 3º ano, tiveram os seguintes dados de saída do software de Análise Econômica de Processos Químicos, disposto no quadro 6.

O cálculo deste software leva em consideração: a taxa de depreciação, custo de utilidades, o imposto de renda e custo de mão de obra.

Quadro 6 - Cálculo dos índices econômicos da planta de surfactina projetada

| <i>Item</i> | <b>Índices econômicos</b>     | <b>Valores</b>                 |
|-------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <b>1</b>    | Valor Presente Líquido (VPL)  | \$ 18.914.846,84               |
| <b>2</b>    | Índice de Lucratividade (IL)  | \$ 1,42                        |
| <b>3</b>    | Taxa Interna de Retorno (TIR) | 49,77%                         |
| <b>4</b>    | Ponto de nivelamento          | capac. min. op. da planta: 25% |
| <b>5</b>    | Tempo de "Pay back"           | 3 anos                         |

Fonte: autoria própria (2022).

A descrição dos índices econômicos presentes neste quadro são:

- **Valor presente líquido (VPL):** define a viabilidade econômica do processo baseado no fluxo de caixa de um certo período descontando-se uma taxa de juros até o final do empreendimento;
- **Índice de lucratividade (IL):** índice que se refere o quanto é retornado para cada unidade de moeda investida;
- **Taxa interna de retorno (TIR):** é a taxa de resultados que serão capitalizados e que a empresa conseguirá obter ao investir no projeto;
- **Ponto de nivelamento:** representando o percentual de capacidade de produção que o processo começa a pagar os custos fixos e variáveis;
- **“Pay-back”:** o tempo necessário de operação da planta para que o investimento inicial seja retornado.

Pelos resultados apresentados nos indicadores da tabela 15 a planta projetada de surfactina apresentou viabilidade econômica com índice de lucratividade de \$1,42 para cada \$1,00 investido, com taxa de retorno de 49,77%, com 3 anos de operação para que se retorne o investimento, com ponto de nivelamento de 25% de produção para pagamento dos custos fixos e variáveis.

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados em escala laboratorial, verificou-se que há potencial de emprego do resíduo borra oleosa originada do refino de óleo vegetal como substrato alternativo para produção da surfactina, tendo em vista que, mantendo-se a temperatura, agitação e pH fixos no processo fermentativo, foi observado nos experimentos que empregaram maiores concentrações da borra que glicose, houve maior produção de surfactina.

A análise realizada por espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier mostrou que o surfactante produzido pelo *B. subtilis* é um lipopeptídeo cíclico comparável à estrutura da molécula de surfactina. Destaca-se que no substrato contendo 3% de glicose e 6% de borra oleosa, foi obtida maior produção de surfactina (126,80 mg/l, em média). Observou-se ainda que as amostras que resultaram menor concentração de surfactina foram dos substratos que tinham menor concentração de borra oleosa em relação a glicose.

Com relação ao fator de conversão de substrato em produto obteve-se um resultado de 5,66 (g de substrato por mg de produto obtido) e uma produtividade em produto de 5,37 (mg/l.h). Pelos resultados apresentados nos indicadores de viabilidade econômica, a planta projetada de surfactina apresentou um índice de lucratividade de \$1,42 para cada \$1,00 investido, com taxa de retorno de 49,77%, sendo viável, economicamente.

Estes resultados demonstraram que a borra originada do resíduo do refino da mistura de óleo vegetal de soja e algodão é um substrato adequado para produção de surfactina pelo *B. subtilis*.

### 5.1 Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestão de trabalhos futuros, de forma a continuar o aprimoramento desta linha de pesquisa, indica-se:

- O aprofundamento de técnicas para purificação da surfactina para ampliar a aplicabilidade deste produto nas áreas alimentícia e farmacêutica;
- Fazer o estudo prático para escala piloto, de forma escalonar a produção do biosurfactante para uma possível escala industrial;
- Aprofundar a viabilidade econômica do projeto, juntamente com um estudo de avaliação da real disponibilidade de substrato e potencial mercado da surfactina.

- Realizar análises da performance ambiental da produção da surfactina, comparada à produção do surfactante sintético.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, V. M. F. *et. al.*; Minimização de resíduos sólidos por adição de biossurfactante em sistema de lodos ativados tratando efluente de refinaria de petróleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA - COBEQ, 20., 2015, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, COBEQ, 2015, vol. 1, n. 2, p.1-8. Disponível em: <https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/17576>. Acesso em: jun. de 2018.
- ALLIED MARKET RESEARCH. Empresa de Pesquisa de Mercado. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com>. Acesso em: abr. de 2019.
- ALMEIDA, K. L. Produção de ramnolipídios por isolados de *Pseudomonas*: avaliação do efeito das fontes de carbono e nitrogênio na composição do ramnolipídio. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: [doi:10.11606/D.42.2012.tde-25052012-095221](https://doi.org/10.11606/D.42.2012.tde-25052012-095221). Acesso em: mai. de 2018.
- AMERICAN OIL CHEMISTS` SOCIETY – AOCS. Metodologia de análise de óleos. Disponível em: <https://www.aocs.org>. Acesso em: fev. de 2019.
- ANTUNES A. A. *et. al.*. Produção de biossurfactante por *chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.3, p. 334-341, 2013. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/8513/50d8b3fc14d41075e0475112d7ee22ea576a.pdf>. Acesso em: mai. de 2018.
- ARAÚJO, J. S. de. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GLVIA usando glicose como substrato e aplicações.** 2018. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/25108>. Acesso em: nov. de 2021.
- ARAÚJO, J. S. **Obtenção de consórcios microbianos produtores de biossurfactantes e biodegradadores de hidrocarbonetos recalcitrantes.** 2021. 90 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021. Disponível em: [https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/32910/1/Obtencaoconsorciosmicrobianos\\_Araujo\\_2021.pdf](https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/32910/1/Obtencaoconsorciosmicrobianos_Araujo_2021.pdf). Acesso em: out. de 2022
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS (ABIOVE). **Estatísticas Safra 2020:** produção de óleos e grãos, São Paulo, Safra 2020. Disponível em: <https://abiove.org.br/estatisticas/>. Acesso em abr. de 2022.
- AUGUSTYN, A. R.; POTT, R. W. M.; TADIE, M. The interactions of the biosurfactant surfactin in coal flotation - colloids and surfaces A: physico chemical and engineering aspects. Department of Process Engineering, University of Stellenbosch - **Elsevier**, South

Afric, Volume 627, 20 October 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127122>. Acesso em: abr. de 2022.

- BACKMAN, J. T.; SPERKER, B.; KROEMER, H. K. O Papel da  $\beta$ -Glucuronidase na Disposição de Medicamentos e Direcionamento de Medicamentos em Humanos. **Farmacocinética Clínica**, volume, 33, p.18–31, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165/00003088-199733010-00003>. Acesso em set. de 2021.
- BANAT, I. M.; SATPUTE S. K.; CAMEOTRA S. S. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' productions. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-18, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4264478/>. Acesso em set. de 2021.
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*. **Elsevier**. n. 26, p. 413-416, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00021-6). Acesso em: out. de 2021.
- BARROS, F. F. C.; *et. al.*; Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Revista Química Nova**, São Paulo, vol.30, n.2, p. 409-414, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/94XRhjCmzpzvymqZTQTVLr/?lang=pt>. Acesso em: out. de 2021.
- BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biosurfactante sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono**. 2012. 125 f. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/15917>. Acesso em: mar. de 2018.
- BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, n. 30, p. 231-236, 1999. Disponível em <https://www.scielo.br/j/rm/a/L6yThf3x98PbHvXLXcKnrRv/?lang=en>. Acesso em: mar. de 2018.
- BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; SILVA, S. S. Recent Advances in Sustainable Production and Application of Biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31–39, 2016. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ind.2015.0027>. Acesso em: mai. de 2018.
- BUENO, G. F. **Produção de biosurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como substrato**. (doutorado em Ciência de Alimentos). UNESP, 2014. 138 f. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/110993>. Acesso em: mai. de 2018.
- BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008, 86 f. Tese (doutorado em

- Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/100904?show=full>. Acesso em: mai. de 2018.
- BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; CRUZ, C. H. G. **Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação.** UNESP - SP. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 7, p. 1572-1577, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/V5jykZ8FrVM9rNrCkMmcdxp/?lang=pt>. Acesso em: jun. de 2018.
- BUITRAGO, J. M. Z.; *et. al.* Identificação direta de microrganismos a partir de hemocultura por espectrometria de massa. **Microbiologia Clínica e Infecção.** Volume 17, Edição 4, p. 546-551, abril 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/4GT8STvc9cVLKxmMjqpnZZy/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: jul. de 2022.
- BULCÃO, T. L. M.; *et. al.* Mapeamento de tecnologias utilizando biossurfactantes para remediação de solos contaminados. In: Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, 4. **Anais...** Gás Natural e Biocombustíveis. CONEPETRO, 2021. Disponível em: <https://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/75342>. Acesso em: jul. de 2022.
- CAMERINI, F. V. *et. al.* **Biosurfactant production by Phialemonium sp. using agroindustrial wastes:** influence of culture conditions. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 41, 2019. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/43484>. Acesso em: set. de 2021.
- CARVALHO, A. P. H. **Qualidade física, química e antimicrobiana de sabões líquidos elaborados com óleo residual de fritura e diferentes agentes saponificantes.** 2013, 186 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, 2013. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/4567/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Andressa%20Pasini%20Herranz%20de%20Carvalho%20-%202013.pdf>. Acesso em: set. de 2018.
- CHAPRÃO, M. J. **Aplicação de biossurfactantes na remediação de areia contaminada com hidrocarbonetos.** 2015. 139 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de processos ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2015. Disponível em: [http://tede2.unicap.br:8080/bitstream/tede/641/1/marcos\\_jose\\_chaprao.pdf](http://tede2.unicap.br:8080/bitstream/tede/641/1/marcos_jose_chaprao.pdf). Acesso em: set. de 2018.
- CHEN, H. L. *et. al.* **Removal of mercury by foam fractionation using surfactin, a biosurfactant.** *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3233467/>. Acesso em: out. de 2018.
- CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S. Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process. **Purification Technology.** n. 59, p.244-252, 2008. Disponível em:



- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383586607002912>. Acesso em: out. de 2018.
- CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal, Review**, v. 103, p. 158-169, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X15300188>. Acesso em: out. de 2018.
- COLLA, L. M.; COSTA J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Revista Vektor** p. 85-103, FURG, 2007, RS. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/vetor/article/view/432>. Acesso em: mai. de 2018.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Brasília, **safra** 2019/20, n. 5, fev 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em abr. 2022.
- CORREA P. F. *et. al.*. Utilização de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, **Anais...** vol.1 num.2, 2014. Disponível em: [https://proceedings.science/proceedings/7/papers/16103/download/fulltext\\_file1](https://proceedings.science/proceedings/7/papers/16103/download/fulltext_file1). Acesso em: jun. de 2018.
- COSTA, C. H. C.; DANTAS FILHO, F. F.; MOITA. MarvinSketch e Kahoot como ferramentas no ensino de isomeria holos, **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte Natal, Brasil** vol. 1, 2017, p. 31-43. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/318534305\\_MARVINSKETCH\\_E\\_KAHOOT\\_COMO\\_FERRAMENTAS\\_NO\\_ENSINO\\_DE\\_ISOMERIA](https://www.researchgate.net/publication/318534305_MARVINSKETCH_E_KAHOOT_COMO_FERRAMENTAS_NO_ENSINO_DE_ISOMERIA). Acesso em: jun. de 2018.
- COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Ramnolipídios e Polihidroxicanoatos (PHAs)**. 2010. 136 f. Tese (doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/103958?show=full>. Acesso em: jun. de 2018.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotenssoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras, **Alimento, Ciência e Tecnologia. Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol. 28, n.1, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/YgGNrJjJgWTsfFk3Drvwr6N/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: jun. de 2018.
- DANGE, S. S. *et. al.*. Biosurfactant: process optimization by classical onde parameter at a time approach. **Research Journal of Biotechnology**, v. 15, 2020. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/348836153\\_Biosurfactant\\_process\\_optimization\\_by\\_classical\\_one\\_parameter\\_at\\_a\\_time\\_approach](https://www.researchgate.net/publication/348836153_Biosurfactant_process_optimization_by_classical_one_parameter_at_a_time_approach). Acesso em: nov. de 2021.

- DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. T. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 25, p. 322-329, 1999. Disponível em: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-924e9b3e-30cc-32fb-9c65-cb09bd709b55>. Acesso em: out. de 2018.
- DEBOIS D.; *et. al.* Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. **Environment Microbiology Rep.** n.7, p. 570, 2015. Disponível em: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1758-2229.12286>. Acesso em: jun. de 2018.
- DORIGHELLO, D. V. **Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja**, 2017, 136 f. Tese (doutorado). UNESP, 2017 Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/151203>. Acesso em: jun. de 2018.
- 
- DRIKS, A. **The *Bacillus* Spore Coat**. Department of Microbiology and Immunology, **The American Phytopathological Society Journal**. Loyola University Medical Center, Maywood, IL 60153. June, 2004. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1249>. Acesso em: jun. de 2018.
- EHRHARDT, D. D. **Caracterização do resíduo do abacaxi e sua utilização no processo de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis***. 2019, 90 f. Tese (doutorado). UNICAMP, 2019. Disponível em: <https://hdl.handle.net/20.500.12733/1637752>. Acesso em: jun. de 2020.
- FAN, H.; *et. al.* Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. **Journal Frontiers in Microbiology**, vol. 8, pgs. 1-13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01973>. Acesso em: jul. de 2018.
- FARIA, A. F. **Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**. 2010, 178 f. Tese (doutorado em Ciência de Alimentos) - UNICAMP, 2010. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detalhe/770182>. Acesso em: abr. de 2018.
- FARIAS, J. M. **Formulação de produtos de higiene oral à base de biossurfactante e quitosana fúngica**. 2019. 140 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2019. Disponível em: <http://tede2.unicap.br:8080/handle/tede/1165>. Acesso em: jun. de 2020.
- FENIBO, E. O. *et. al.* Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 1-29, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31752381/>. Acesso em: jul. de 2020.

- FOX, S.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, n. 75, p. 235-240, 2000. Disponível em: DOI:[10.1016/S0960-8524\(00\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00059-6). Acesso em: abr. de 2018.
- FRANÇA, W. L.; *et. al.* **Avaliação de substratos de baixo custo na produção de biosurfactantes do tipo lipopeptídeos**. XX Congresso Brasileiro de Enga. Química. SC, Outubro, 2014. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1615-18422-180872.pdf>. Acesso em: abr. de 2018.
- FRÉ, N. C.; RECH, R. Otimização do processo de obtenção de ácidos graxos à partir da borra de refinamento do óleo de soja, subproduto das indústrias de óleo e biodiesel. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/197061/000913210.pdf?sequence=1>. Acesso em: jun. de 2018.
- FRITZE, D. **Taxonomy of the Genus Bacillus and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria**. *Phytopathology*. 2004 Nov; 94(11):1245-8. Disponível em: DOI: [10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245](https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245). Acesso em: jun. de 2018.
- GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. **Biotechnol Res Int**. 2011. Disponível em: [doi: 10.4061/2011/653654](https://doi.org/10.4061/2011/653654). Acesso em: jul. de 2018.
- GIDUDU, B.; CHIRWA, E. M. N. Biosurfactants as demulsification enhancers in bioelectrokinetic remediation of petroleum contaminated soil. Process safety and environmental protection, **Process Safety and Environmental Protection**. vol. 143, (November 2020). Disponível em: [https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/79238/Gidudu\\_Biosurfactant\\_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/79238/Gidudu_Biosurfactant_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y) Acesso em: nov. de 2021.
- GONZAGA, L. V. **Surfactina desidratada como agente potencializador da biorremediação de solos contaminados com petróleo**. 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). UFV, 2013. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/5369/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: jun. de 2018.
- HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In SCHIMIDELL, W.; *et. al.* *Biotechnology Industrial*, SP, Ed. Edgard Blucher, 2001.
- HUY, N. Q. *et. al.* Characterization of petroleum-degrading bacteria from oil-contaminated sites in Vietnam. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 100-102, 1999. DOI: [10.1016/s1389-1723\(99\)80184-4](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80184-4). Acesso em: jun. de 2019.

- HWANG, S.; CUTRIGH, T. J. Bio degradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. **Chemosphere**, n. 47, p. 891-899, 2002. Disponível em: DOI: [10.1016/s0045-6535\(02\)00016-4](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(02)00016-4). Acesso em: jun. de 2019.
- IJAH, U. J. J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. **Waste Management**, n. 18, p. 293-299, 1988. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-053X\(98\)00037-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-053X(98)00037-3). Acesso em: mai. de 2019.
- JACOBSEN, E. N.; ARROW, J. F. Processos assimétricos catalisados por complexos metálicos quirais. **Organometálicos em química de processos**. vol. 6. p. 123-152, 2004. Disponível em: <https://revistas.anchieta.br/index.php/revistaargumento/article/view/613>. Acesso em: jun. de 2018.
- JAHAN, R. *et. al.* Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 275, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31767119/>. Acesso em: nov. de 2021.
- JANEK, T; *et. al.* Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. **MDPI Journal molecule**, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/12/3488>. Acesso em: jun. de 2022.
- JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 184, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319309388>. Acesso em: set. de 2021.
- JÖNK, M. W.; *et. al.* Estudo de meio de cultura para *Bacillus subtilis* CCT516 utilizando técnica de planejamento experimental. **Anais... XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, vol.1, n.2, 2014. Disponível em: DOI:[10.5151/chemeng-cobeq2014-1501-18977-143693](https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1501-18977-143693). Acesso em: set. de 2018.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A.J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20b. **Bioresour. Technol.**, n. 99, p. 4603–4608, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17855083/>. Acesso em: set. de 2018.
- JUN, A. *et. al.* **Reatividade de Compostos Orgânicos II e Biomoléculas - lipídios, ácidos graxos e fosfolipídeos**. UNESP, São Paulo, 2016. Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4142443/mod\\_resource/content/0/08\\_Resumo\\_Lipideos.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4142443/mod_resource/content/0/08_Resumo_Lipideos.pdf). Acesso em: set. de 2019.
- KAKINUMA A. *et. al.* Determination of aminoacid sequence in surfactin, a crystalline peptide lipid surfactante produced by *Bacillus subtilis*. **Agric. Biol. Chem.** vol. 33, Ed. 6, p. 971-972, 1969. Disponível em: <https://academic.oup.com/bbb/article-abstract/33/6/971/5977523?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: set. de 2019.

- KASPAR, F.; NEUBAUER, P.; GIMPEL M. **Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review**. *Journal of Natural Products*, v.82, p. 2038-2053, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31287310/>. Acesso em: out. de 2021.
- KIM, S. H. *et al.*. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**, n. 31, p. 249-253, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10814597/>. Acesso em: out. de 2021.
- KONEMAN, E. W.; ALLE, S. **Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. Washington, 2008.
- KUMAR, V., *et al.* Fast Fourier infrared spectroscopy to characterize the biochemical composition in diatoms. **J. Biosci.** n. 43, p. 717–729, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12038-018-9792-z>. Acesso em: jul. de 2021.
- KUYUKINA, M. S. *et al.* Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, n. 46, p. 149-156, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11412925/>. Acesso em: dez. de 2018.
- LARINI, M. M. *et al.*. Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. **Evidência**, Joaçaba v. 17, n. 2, p. 105-118, jul./dez. 2017. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/321942869\\_Surfactina\\_estrutura\\_aplicacoes\\_e\\_fatores\\_envolvidos\\_em\\_sua\\_producao](https://www.researchgate.net/publication/321942869_Surfactina_estrutura_aplicacoes_e_fatores_envolvidos_em_sua_producao). Acesso em: set. de 2020.
- LIMA, C. J. B. **Produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. 2010. 190 f. (Tese Doutorado em engenharia química), UFUB, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15097/1/CJBLimaTESPRT.pdf>. Acesso em: jun. de 2018.
- LIMA, S. D. *et al.*. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 354–361, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/j4rjcVHY5BfGJwjzpnrywwy/?lang=en>. Acesso em: jun. de 2022.
- LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; UM, B. Z. Isolation and characterization of a C12 lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **J. Pept. Sci.** v. 14 p. 864-875. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18265435/>. Acesso em: jun. de 2018.
- LOTFABAD, T. B. *et al.*. Evaluation of a recycling bioreactor for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 using soybean oil waste. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.4733>. Acesso em: out. de 2018.
- LUNA, J. M. *et al.* Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current Microbiology**, n. 62, p.1527-1534, 2011. Disponível em:

[https://www.academia.edu/13705020/Evaluation\\_Antimicrobial\\_and\\_Antiadhensive\\_Properties\\_of\\_the\\_Biosurfactant\\_Lunasan\\_Produced\\_by\\_Candida\\_sphaerica\\_UCP\\_0995](https://www.academia.edu/13705020/Evaluation_Antimicrobial_and_Antiadhensive_Properties_of_the_Biosurfactant_Lunasan_Produced_by_Candida_sphaerica_UCP_0995).

Acesso em: out. de 2018.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11954787/>. Acesso em: out. de 2018.

MARCELINO, P. R. F. *et. al.*. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosichydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops e Products**, v. 129, p. 212-223, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/185383>. Acesso em: nov. de 2021.

MARIM, M. G. **Obtaining of biosurfactant by Bacillus subtilis ATCC 9372 from sugar cane molasses**. 51 f. (Monografia graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2014. Disponível em: [https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6627/3/CM\\_COEAL\\_2014\\_2\\_14.pdf](https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6627/3/CM_COEAL_2014_2_14.pdf). Acesso em: out. de 2018.

MARIM, M. G.; LIMA, M. V. S.; BONA E. **Otimização da obtenção de biosusfactante por bacillus subtilis ATCC (9372) a partir de melão de cana-de-açúcar**. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - Unicamp - Campinas, SP, julho de 2015. Disponível em: <https://docplayer.com.br/71657626-Otimizacao-da-obtencao-de-biosurfactante-por-bacillus-subtilis-atcc-9372-a-partir-de-melaco-de-cana-de-acucar.html>. Acesso em: set. de 2018.

MARKETS AND MARKETS. **Biosurfactants market by type (glycolipids (sophorolipids, rhamnolipids), lipopeptides, phospholipids, polymeric biosurfactants), application (detergents, personal care, agricultural chemicals, food processing), and region. Global forecast. 2022**. Disponível em: [www.marketsandmarkets.com/pdfdownloadNew.asp?id=163644922](http://www.marketsandmarkets.com/pdfdownloadNew.asp?id=163644922). Acesso em: set. 2022.

MAROLDI, W. V. **Obtenção, purificação e caracterização de Biosurfactante obtido por bacillus subtilis atcc 9372 Depto alimentos**. 2015. 173f. Tese (Doutorado em Engenharia de alimentos.) UTFPr, 2015. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/296857626.pdf>. Acesso em: maio de 2019.

MOHAMADD, A. *et. al.*. Rahnolipids: diversity of structures microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1323-1336, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20336292/>. Acesso em: abr. de 2018.

MORAIS, A. P. S. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização físico-química**. 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/90481>. Acesso em: jul. de 2019.

- MORAIS, I. B. S.; ANGELIS, L. H. Biotensoativo, uma alternativa mais limpa para indústria de cosméticos. **Revista do Centro Universitário Newton Paiva**, ED. 6, p. 186-194, 2012. Disponível em: <https://docplayer.com.br/11676720-Biotensoativos-uma-alternativa-mais-limpa-para-as-industrias-de-cosmeticos.html>. Acesso em: jul. de 2019.
- MULLIGAN, C. N. Sustainable remediation of contaminated soil using biosurfactants. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 1–9, 2021. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/350472060\\_Sustainable\\_Remediation\\_of\\_Contaminated\\_Soil\\_Using\\_Biosurfactants](https://www.researchgate.net/publication/350472060_Sustainable_Remediation_of_Contaminated_Soil_Using_Biosurfactants). Acesso em: jul. de 2022.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, NIH, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB018486>. Acesso em: nov. de 2022.
- NITSCHKE, M. *et. al.* Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, n.5, p. 62-66, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16209563/>. Acesso em: jun. de 2018.
- NITSCHKE, M. *et. al.* Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n.7 p. 66-74, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19649781/>. Acesso em: jun. de 2018.
- OLIVEIRA, D. W. F. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado.** 2013, 163 f. Dissertação (mestrado em engenharia química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/15753>. Acesso em: jun. de 2018.
- PEREIRA, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. **Quím. Nova**, n. 25, Maio 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/BsNtkPsC6XmJTTQkHZp43xF/?lang=pt>. Acesso em: jun. de 2018.
- PEREIRA, J.F.B. *et. al.* Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, n. 111, p. 259–268. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236113003414>. Acesso em: mar. de 2019.
- PEREZ, K. J. **Caracterização de lipopeptídeos antimicrobianos e surfactantes produzidos por *bacillus spp.* isolados de puba.** 2014. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-APCP8N>. Acesso em set. de 2019.
- PERLINGEIRO, C. A. G.; **Engenharia de processos: análise, simulação, otimização e síntese de processos químicos.** Ed. Bluncher, 2.ed., 2018.

- PHULPOTO, I. A. *et. al.*. Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and it's potential for oil contaminated soil remediation. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32690027/>. Acesso em: jul. de 2021.
- PIGGOT, J.; HILBERT, D. W. Esporulação de *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**. Vol. 7, Issue 6, p. 579-586, Dec. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15556029/>. Acesso em: out. de 2020.
- PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da Produção de Biosurfactante utilizando Hidrocarboneto**. 2006. 61 f. Dissertação de Mestrado, UNESP, 2006. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/94960>. Acesso em: jul. de 2021.
- PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da Produção de Biosurfactante utilizando Hidrocarboneto**. 2006. v, 61 f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas), UNESP, 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/94960>. Acesso em: jun. de 2018.
- PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha da cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento à vapor e hidrólise enzimática**. 2007, 142 f. Dissertação (Mestrado). Curso de Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/15870?show=full>. Acesso em: mar. de 2018.
- PORTER, J R.; LEEUWENHOEK, A. Tercentenary of his discovery of bacteria. **Bacteriolog. Rev.**, v. 40, n. 2, p. 260-269, 1976. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413956/>. Acesso em: jun. de 2019.
- PORTO, A. L. F.; SANTOS, E. F.; SARUBBO, L. A. Patente de Invenção: biosurfactante e processo para a sua produção, PI 1105951-6 A2, UFRPe, 2013. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br › tede › bitstream › tede2>. Acesso em: mai. de 2018.
- PURWASENA, I. A.; ASTUTI, D. I.; UTAMI, A. G. Nitrogen Optimization on Rhamnolipid Biosurfactant Production from *Pseudoxanthomonas* sp. G3 and Its Preservation Techniques. **Sains Malaysiana**, v. 49, p. 2119-2127, 2020. Disponível em: [http://www.ukm.my/jsm/pdf\\_files/SM-PDF-49-9-2020/10.pdf](http://www.ukm.my/jsm/pdf_files/SM-PDF-49-9-2020/10.pdf). Acesso em: out. de 2021.
- RAMALHO, H. F.; SUAREZ P. A. Z. A Química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Química**. Universidade de v. 5, n.1, p. 2-15, Brasília, 2012. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/360>. em: jun. de 2018.
- RICHTER, M. *et. al.*. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tu1 901/8c. **FEMS Microbiology Letters**, p. 163-165, 1998. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13041.x>. Acesso em: jun. de 2018.



- ROCHA, P. M. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão da cana como substrato.** 2017. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), 2017, UFRN. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/23394>. Acesso em: set. de 2019.
- RODRIGUES, M. S. **Produção de biossurfactantes utilizando melão de soja.** 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2016.417>. Acesso em: set. de 2019.
- ROVINA F.; EHRHARDT, D. D.; TAMBOURGI, E. B. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Scientia plena**, vol. 14, n. 4, abril de 2018. Disponível em: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/3928>. Acesso em: jun. de 2018.
- SANTANA, L. O. S.; BISPO, A. S; PESSOA, L. F. P. Estudo de viabilidade para implementação de uma biorrefinaria de milho no Oeste baiano. **Anais...** do I encontro web de Engenharia Química. SENAI CIMATEC, Julho, 2021. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/352951140\\_Estudo\\_de\\_Viabilidade\\_Para\\_Implimentacao\\_de\\_uma\\_Biorrefinaria\\_de\\_Milho\\_no\\_Oeste\\_Baiano\\_Analise\\_de\\_Mercado](https://www.researchgate.net/publication/352951140_Estudo_de_Viabilidade_Para_Implimentacao_de_uma_Biorrefinaria_de_Milho_no_Oeste_Baiano_Analise_de_Mercado). Acesso em: set. de 2022.
- SANTIAGO, M. R. F. **Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria de petróleo.** 2019. 154 f. Tese (doutorado em processos químicos) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: [http://epqb.eq.ufrj.br/wp-content/uploads/2021/10/d19\\_08.pdf](http://epqb.eq.ufrj.br/wp-content/uploads/2021/10/d19_08.pdf). Acesso em: nov. de 2020.
- SANTOS, C. V. M. *et. al.*. Biossurfactante: conceitos gerais e perspectivas. **Ambiente & Sociedade: concepções, fundamentos, diálogos e práticas para conservação da natureza**, 2021. Disponível em: <https://downloads.editoracientifica.org/articles/210604986.pdf>. Acesso em: fev. de 2022.
- SANTOS, F. M.; SIMÕES, J. C.; SILVA, J. R. A. Otimização das condições de extração de saponinas em *ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 9, p. 1629-1633, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/XcD3YZX6bJZ8n9kfMKQBxxc/?lang=pt>. Acesso em: out. de 2018.
- SANTOS, G. S.; PESSOA, F. L. P.; CALIXTOS, E. E. S. Desenvolvimento de um programa computacional para avaliação econômica de processos químicos. **Anuário de resumos expandidos apresentados no VII SAPCT - SENAI CIMATEC**, 2022. ISSN 0805-2010.
- SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido.** 2012, 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - UFRJ, 2012. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/3623>. Acesso em: jun. de 2018.

- SENA, H. H.; *et. al.* Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. **Hindawi International Journal of Microbiology Article**. ID 5684261, 8 pages, 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2018/5684261/>. Acesso em: Acesso em: nov. de 2018.
- SEO, J. *et. al.* An infrared spectroscopy approach to follow  $\beta$ -sheet formation in peptide amyloid assemblies. **Nat. Chem.** n. 9, p. 39, 2017. Disponível em: [An infrared spectroscopy approach to follow  \$\beta\$ -sheet formation in peptide amyloid assemblies | Nature Chemistry](#). Acesso em: jul. de 2019.
- SEYDLOVÁ G, SVOBODOVÁ J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**. n. 3, p.123-33, 2007. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/s11536-008-0002-5/html>. Acesso em: Acesso em: mar. de 2019.
- SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin: a review on biosynthesis fermentation, purification and applications. **Food Technol. Biotechnol**, v. 48, n. 2, p. 119-134, 2010. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/228354663\\_Surfactin-A\\_Review\\_on\\_Biosynthesis\\_Fermentation\\_Purification\\_and\\_Applications](https://www.researchgate.net/publication/228354663_Surfactin-A_Review_on_Biosynthesis_Fermentation_Purification_and_Applications). Acesso em: abr. de 2020.
- SHATILA, F. *et. al.*. The effect of carbon, nitrogen and iron ions on mono-rhamnolipid production and rhamnolipid synthesis gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. **Archives of Microbiology**, v. 2021, p. 1407-1417, 2020. Disponível em: DOI: [10.1007/s00203-020-01857-4](https://doi.org/10.1007/s00203-020-01857-4). Acesso em: abr. de 2022.
- SHODA, M. Controle Bacteriano de Doenças de Plantas. **Jornal de Biociência e Bioengenharia**, v. 89, p. 515-521, 2000.
- SILVA, M. C. P. **Disponibilidade, pré-tratamento de matéria prima e projeto de reator a explosão à vapor para produção de E2G**. 2021, 83f. Dissertação (Mestrado em Regulação da Indústria e Energia), UNIFACS, Salvador, 2015. Disponível em: <http://teste.tede.unifacs.br:8080/tede/handle/tede/454>. Acesso em: jul. de 2021.
- SILVEIRA, D. A.; VIEIRA, G. E. **Emprego do óleo residual de fritura na produção de biodiesel** vol. 1 num. 2 - XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2015. Disponível em: <https://scholar.archive.org/work/zfs76zc6yzf6xisnhd26lsrd3a>. Acesso em: maio de 2018.
- SOARES, D. W. F. **Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por *Bacillus sp* isoladas de estação de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais**. 2014. Tese (Doutorado em química), UFCE, 2014. Disponível em: [PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES OBTIDOS POR LINHAGENS de \*Bacillus sp\*. ISOLADAS DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS E DE SOLO DE MANGUEZAIS \(CEARÁ - BRASIL\) \(ufc.br\)](#). Acesso em: jun. de 2018.

- SOUSA, M. *et. al.* Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* lami005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** Vol. 31, No. 03, p. 613 - 623, 2014. Disponível em: doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.09.009. Acesso em: jul. de 2020.
- SOUZA, M. R. *et. al.*. Produção de biosurfatante e lípidos por uma nova cepa de *Absidia cylindrospora* UCP 1301, isolada no solo da Caatinga usando subprodutos agroindustriais de baixo custo. *Brazilian Journal of Development*, v.7 n.1 p 8300-8313, 2021. Disponível em: DOI:[10.34117/bjdv7n1-564](https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-564). Acesso em: jul. de 2022.
- STELTE, W. **Steam explosion for biomass pre-treatment**. Centre for Renewable Energy and Transport. Section for Biomass: Danish Technological Institute, Copenhagen - Dinamarca, 2013. Disponível em: [W. Stelte, "Steam Explosion for Biomass Pretreatment, Energy and Climate," Centre for Renewable Energy and Transport Section for Biomass, Danish Technological Institute, 2013. - References - Scientific Research Publishing \(scirp.org\)](https://www.scrip.org/References/Scientific-Research-Publishing). Acesso em: jun. de 2019.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, L. C. **Microbiologia**. 10. Ed. UFRGS, Porto Alegre, 2012.
- UMAR, A. *et. al.* Low-cost production and application of lipopeptide for bioremediation and plant growth by *Bacillus subtilis* SNW3. **AMB Express**. 2021. Disponível em: DOI 10.1186/s13568-021-01327-0. Acesso em: jul. de 2022.
- VERA, E. C. S. *et. al.*. Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1333, p. 168-178, 2018. Disponível em: [Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance \(BLIS\) production by Lactococcus lactis CECT-4434 from agroindustrial waste. \(cabdirect.org\)](https://www.cabdirect.org/). Acesso em: fev. de 2021.
- VOLKMANN, G. C. M.; JENSKE, G.; KREMER, L. C. **Determinação de ácidos graxos em alimentos por cromatografia gasosa**, 2017. Disponível em: [Determinação de Ácidos Graxos em Alimentos por Cromatografia Gasosa – Freitag Laboratórios](https://www.freitaglaboratorios.com.br/). Acesso em: abr. de 2018.
- WEI Y. H.; LAI C. C.; CHANG J. S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochem.** n. 5, p. 40-42-5, doi: 10.1016, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.025>. Acesso em: jul. de 2018.
- WEI, Y. H.; WANG, L. F.; CHANG, J. S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Prog.**, v.20, n. 3, p. 979-983, 2004. Disponível em: [Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with Bacillus subtilis - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/). Acesso em: jul. de 2021.

- WU, J.; JU, L. K. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, n. 59, p. 193-202, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9519480/>. Acesso em ago. de 2019.
- WU, Y.; *et. al.*. Anticancer activities of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. **Journal Frontiers in Pharmacology**, vol. 8, 2017. Disponível em: [Frontiers | Anticancer Activities of Surfactin and Potential Application of Nanotechnology Assisted Surfactin Delivery \(frontiersin.org\)](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00008). Acesso em: jul. de 2021.
- YOUSSEF N. H. *et. al.*. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiology Methods**, n.3, p. 339-347, 2004. Disponível em: [Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms - PubMed \(nih.gov\)](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15111111/). Acesso em: set. de 2018.
- ZHENG, Y. *et. al.*. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. **Progress in energy and combustion science**, Elsevier, Ohio, v.42, p.35-53, jun. 2014. Disponível em: [Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production - ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360547714000081). Acesso em: jul. de 2018.

**APÊNDICE 1: PLANILHAS COM RESULTADOS (IE24) PARA OS 6 GRUPOS DE EXPERIMENTOS  
COM DIFERENTES PARES DE BORRA E GLICOSE EM % EM MASSA.**

| 11 | A  | B         | C     | D     | E          | F        | G        | H   | I   | J   | K    | L        | M   | N   | O   | P     | Q | R   | S   | T   | U |
|----|--|-----------|-------|-------|------------|----------|----------|-----|-----|-----|------|----------|-----|-----|-----|-------|---|-----|-----|-----|---|
| 1  | <b>APÊNDICE 1</b>  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 2  |  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 3  | <b>Entre Jul/19 a Ago/21 foram feitos 6 experimentos variando a planificação estrea. Todos experimentos foram feitos em duplicata e os resultados do teste de emulsão E24 estão ao lado com desvio padrão (dp) e Média aritmética.</b> |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 4  | <b>O objetivo na linha evolutiva dos experimentos foi aumentar o % de borra em relação à glicose no planejamento estrea e comparar resultados com IE24. (vide equações na coluna G, de cada planejamento estrea).</b>                  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 5  | <b>O maior e o menor resultado do teste de emulsão E24 está tarjado, respectivamente, em laranja e amarelo, na última coluna, explicitando a evolução dos experimentos.</b>  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 6  | 1o   | jul/19    |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 7  |  | (-Rz2)    | -1    | 0     | 1          | Rz2      |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 8  | Glicose(f1)  | 0,59%     | 1,00% | 2,00% | 3,00%      | 3,41%    |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 9  | Borra (f2)   | 0,00%     | 0,00% | 1,00% | 2,00%      | 2,41%    |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 10 | Pt   | Codificad | f(1)  | f(2)  | glicose(g) | borra(g) |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 11 | 1  | (-1,-1)   | 1,00% | 0,00% | 0,77       | 0,00     | 1        | 1,1 | 3,6 | 31% | 0,00 | 1        | 1,1 | 3,6 | 31% | média |   | 1,1 | 3,6 | 31% |   |
| 12 | 2  | (1,-1)    | 3,00% | 0,00% | 2,31       | 0,00     | 2        | 1,0 | 3,5 | 29% | 0,01 | 2        | 1,1 | 3,6 | 31% |       |   | 1,1 | 3,6 | 30% |   |
| 13 | 3  | (-1,1)    | 1,00% | 2,00% | 0,77       | 1,54     | 3        | 1,2 | 3,4 | 35% | 0,00 | 3        | 1,3 | 3,7 | 35% |       |   | 1,3 | 3,6 | 35% |   |
| 14 | 4  | (1,1)     | 3,00% | 2,00% | 2,31       | 1,54     | 4        | 1,2 | 3,5 | 34% | 0,01 | 4        | 1,2 | 3,7 | 32% |       |   | 1,2 | 3,6 | 33% |   |
| 15 | 5  | (0,0)     | 2,00% | 1,00% | 1,54       | 0,77     | 5        | 1,2 | 3,8 | 32% | 0,01 | 5        | 1,2 | 3,6 | 33% |       |   | 1,2 | 3,7 | 32% |   |
| 16 | 6  | (0,0)     | 2,00% | 1,00% | 1,54       | 0,77     | 6        | 1,1 | 3,4 | 32% | 0,02 | 6        | 1,3 | 3,7 | 35% |       |   | 1,2 | 3,6 | 34% |   |
| 17 | 7  | (0,0)     | 2,00% | 1,00% | 1,54       | 0,77     | 7        | 1,1 | 3,5 | 31% | 0,01 | 7        | 1,2 | 3,7 | 32% |       |   | 1,2 | 3,6 | 32% |   |
| 18 | 8  | (-Rz2,0)  | 0,59% | 1,00% | 0,46       | 0,77     | 8        | 1,2 | 3,4 | 35% | 0,00 | 8        | 1,3 | 3,7 | 35% |       |   | 1,3 | 3,6 | 35% |   |
| 19 | 9  | (0,-Rz2)  | 2,00% | 0,00% | 1,54       | 0,00     | 9        | 1,0 | 3,8 | 26% | 0,01 | 9        | 1,1 | 3,9 | 28% |       |   | 1,1 | 3,9 | 27% |   |
| 20 | 10   | (Rz2,0)   | 3,41% | 1,00% | 2,62       | 0,77     | 10       | 1,1 | 3,3 | 33% | 0,00 | 10       | 1,2 | 3,6 | 33% |       |   | 1,2 | 3,5 | 33% |   |
| 21 | 11   | (0,Rz2)   | 2,00% | 2,41% | 1,54       | 1,86     | 11       | 1,2 | 3,7 | 32% | 0,01 | 11       | 1,1 | 3,5 | 31% |       |   | 1,2 | 3,6 | 32% |   |
| 22 |  |           |       |       |            |          | Surfact. | 1,7 | 3,5 | 49% | 0,00 | Surfact. | 1,9 | 3,9 | 49% |       |   | 1,8 | 3,7 | 49% |   |
| 23 |  |           |       |       |            |          | inds     |     |     |     |      | inds     |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 24 |  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 25 |  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 26 |  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 27 |  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |
| 28 |  |           |       |       |            |          |          |     |     |     |      |          |     |     |     |       |   |     |     |     |   |





|     | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| H95 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 69  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 70  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 71  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 72  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 73  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 74  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 75  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 76  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 77  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 78  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 79  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 80  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 81  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 82  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 83  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 84  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 85  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 86  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 87  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 88  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 89  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 90  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 91  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 92  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 93  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 94  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 95  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| 96  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

|  | Amostras      | Altura camada emulsificada (cm) | Altura Total (cm) | %   | dp   | Amostras      | Altura camada emulsificada (cm) | Altura Total (cm) | %   |
|--|---------------|---------------------------------|-------------------|-----|------|---------------|---------------------------------|-------------------|-----|
|  | 1             | 1,1                             | 3,6               | 31% | 0,03 | 1             | 1,1                             | 3,2               | 34% |
|  | 2             | 1,0                             | 3,5               | 29% | 0,01 | 2             | 1,1                             | 3,7               | 30% |
|  | 3             | 1,3                             | 3,6               | 36% | 0,01 | 3             | 1,3                             | 3,5               | 37% |
|  | 4             | 1,4                             | 3,6               | 39% | 0,00 | 4             | 1,5                             | 3,8               | 39% |
|  | 5             | 1,3                             | 3,8               | 34% | 0,01 | 5             | 1,3                             | 3,6               | 36% |
|  | 6             | 1,2                             | 3,4               | 35% | 0,00 | 6             | 1,3                             | 3,7               | 35% |
|  | 7             | 1,2                             | 3,4               | 35% | 0,02 | 7             | 1,2                             | 3,7               | 32% |
|  | 8             | 1,3                             | 3,7               | 35% | 0,01 | 8             | 1,3                             | 3,8               | 34% |
|  | 9             | 1,0                             | 3,8               | 26% | 0,00 | 9             | 1,0                             | 3,9               | 26% |
|  | 10            | 1,1                             | 3,3               | 33% | 0,03 | 10            | 1,0                             | 3,5               | 29% |
|  | 11            | 1,3                             | 3,5               | 37% | 0,01 | 11            | 1,2                             | 3,4               | 35% |
|  | 12            | 1,0                             | 3,6               | 28% | 0,02 | 12            | 1,0                             | 3,9               | 26% |
|  | Surfact. inds | 1,7                             | 3,4               | 50% | 0,01 | Surfact. inds | 2,0                             | 3,9               | 51% |

|  | Amostras      | Altura camada emulsificada (cm) | Altura Total (cm) | %   |
|--|---------------|---------------------------------|-------------------|-----|
|  | 1             | 1,1                             | 3,4               | 32% |
|  | 2             | 1,1                             | 3,6               | 29% |
|  | 3             | 1,3                             | 3,6               | 37% |
|  | 4             | 1,5                             | 3,7               | 39% |
|  | 5             | 1,3                             | 3,7               | 35% |
|  | 6             | 1,3                             | 3,6               | 35% |
|  | 7             | 1,2                             | 3,6               | 34% |
|  | 8             | 1,3                             | 3,8               | 35% |
|  | 9             | 1,0                             | 3,9               | 26% |
|  | 10            | 1,1                             | 3,4               | 31% |
|  | 11            | 1,3                             | 3,5               | 36% |
|  | 12            | 1,0                             | 3,8               | 27% |
|  | Surfact. inds | 1,9                             | 3,7               | 51% |



|     | A  | B           | C         | D     | E      | F          | G        | H                 | I   | J   | K   | L | M             | N   | O   | P   | Q | R | S | T | U |
|-----|----|-------------|-----------|-------|--------|------------|----------|-------------------|-----|-----|-----|---|---------------|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|
| 92  |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 93  |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 94  |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 95  |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 96  |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 97  | 50 | jun/21      |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 98  |    | (-Rz2)      | -1        | 0     | 1      | Rz2        |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 99  |    | Glicose(f1) | 0,00%     | 2,00% | 4,00%  | 4,82%      | 2*x+2    | 50 exp. duplic. 1 |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 100 |    | Borra (f2)  | 0,34%     | 2,00% | 6,00%  | 10,00%     | 4*x+6    |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 101 |    | Pt          | Codificad | f(1)  | f(2)   | glicose(g) | borra(g) |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 102 |    | 1           | (-1, -1)  | 0,00% | 2,00%  | 0,00       | 1,54     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 103 |    | 2           | (1, -1)   | 4,00% | 2,00%  | 3,09       | 1,54     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 104 |    | 3           | (-1, 1)   | 0,00% | 10,00% | 0,00       | 7,70     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 105 |    | 4           | (1, 1)    | 4,00% | 10,00% | 3,09       | 7,70     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 106 |    | 5           | (0, 0)    | 2,00% | 6,00%  | 1,54       | 4,62     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 107 |    | 6           | (0, 0)    | 2,00% | 6,00%  | 1,54       | 4,62     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 108 |    | 7           | (0, 0)    | 2,00% | 6,00%  | 1,54       | 4,62     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 109 |    | 8           | (-Rz2, 0) | 0,00% | 6,00%  | 0,00       | 4,62     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 110 |    | 9           | (0, -Rz2) | 2,00% | 0,34%  | 1,54       | 0,39     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 111 |    | 10          | (Rz2, 0)  | 4,82% | 6,00%  | 3,71       | 4,62     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 112 |    | 11          | (0, Rz2)  | 2,00% | 11,65% | 1,54       | 8,97     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 113 |    | 12          | em branco | 4,00% | 0,00%  | 3,09       | 0,00     |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 114 |    |             |           |       |        |            |          | Surfact. inds     | 1,6 | 3,5 | 46% |   | Surfact. inds | 1,8 | 3,5 | 51% |   |   |   |   |   |
| 115 |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 116 |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 117 |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 118 |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 119 |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |
| 120 |    |             |           |       |        |            |          |                   |     |     |     |   |               |     |     |     |   |   |   |   |   |

Planilha1

| A   | B           | C          | D     | E      | F          | G        | H                             | I  | J                    | K   | L    | M        | N  | O                    | P   | Q    | R  | S                    | T   | U                   |  |
|-----|-------------|------------|-------|--------|------------|----------|-------------------------------|--|----------------------|-----|------|----------|--|----------------------|-----|------|--|----------------------|-----|---------------------|--|
| 115 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 116 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 117 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 118 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 119 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 120 | 60          | ago/21     |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 121 |             | (-Rz2)     | -1    | 0      | 1          | Rz2      |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 122 | Glicose(f1) | 0,17%      | 1,00% | 3,00%  | 5,00%      | 5,83%    | 60 exp.,<br>2*x+3<br>duplic.1 |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 123 | Borra (f2)  | 0,34%      | 2,00% | 6,00%  | 10,00%     | 11,65%   | 60 exp.,<br>4*x+6<br>duplic.1 |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 124 | Pt          | Codificadç | f(1)  | f(2)   | glicose(g) | borra(g) |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 125 | 1           | (-1,-1)    | 1,00% | 2,00%  | 0,77       | 1,54     |                               | Altura<br>camada<br>emulsificada<br>(cm) | Altura Total<br>(cm) | %   | dp   | Anostras | Altura<br>camada<br>emulsificada<br>(cm) | Altura Total<br>(cm) | %   |      | Altura<br>camada<br>emulsificada<br>(cm) | Altura Total<br>(cm) | %   | CLAE conc<br>mg.L-1 |  |
| 126 | 2           | (1,-1)     | 5,00% | 2,00%  | 3,85       | 1,54     |                               | 1,1                                      | 3,6                  | 31% | 0,00 | 1        | 1,1                                      | 3,6                  | 31% | 0,31 | 1,1                                      | 3,6                  | 31% | 49,15               |  |
| 127 | 3           | (-1,-1)    | 1,00% | 10,00% | 0,77       | 7,70     |                               | 1,3                                      | 3,5                  | 37% | 0,02 | 2        | 1,4                                      | 3,5                  | 40% | 0,39 | 1,4                                      | 3,5                  | 39% | 74,21               |  |
| 128 | 4           | (1,1)      | 5,00% | 10,00% | 3,85       | 7,70     |                               | 1,2                                      | 3,4                  | 35% | 0,02 | 3        | 1,3                                      | 3,4                  | 38% | 0,37 | 1,3                                      | 3,4                  | 37% | 128,15              |  |
| 129 | 5           | (0,0)      | 3,00% | 6,00%  | 2,31       | 4,62     |                               | 1,3                                      | 3,5                  | 37% | 0,00 | 4        | 1,3                                      | 3,5                  | 37% | 0,37 | 1,3                                      | 3,5                  | 37% | 110,11              |  |
| 130 | 6           | (0,0)      | 3,00% | 6,00%  | 2,31       | 4,62     |                               | 1,5                                      | 3,8                  | 39% | 0,01 | 5        | 1,5                                      | 3,7                  | 41% | 0,40 | 1,5                                      | 3,8                  | 40% | 125,08              |  |
| 131 | 7           | (0,0)      | 3,00% | 6,00%  | 2,31       | 4,62     |                               | 1,4                                      | 3,4                  | 41% | 0,02 | 6        | 1,5                                      | 3,4                  | 44% | 0,43 | 1,5                                      | 3,4                  | 43% | 128,52              |  |
| 132 | 8           | (-Rz2,0)   | 0,17% | 6,00%  | 0,13       | 4,62     |                               | 1,4                                      | 3,6                  | 39% | 0,05 | 7        | 1,5                                      | 3,3                  | 45% | 0,42 | 1,5                                      | 3,5                  | 42% | 126,80 medi         |  |
| 133 | 9           | (0,-Rz2)   | 3,00% | 0,34%  | 2,31       | 0,26     |                               | 1,4                                      | 3,5                  | 40% | 0,02 | 8        | 1,5                                      | 3,5                  | 43% | 0,41 | 1,5                                      | 3,5                  | 41% | 83,23               |  |
| 134 | 10          | (Rz2,0)    | 5,83% | 6,00%  | 4,49       | 4,62     |                               | 1,2                                      | 3,8                  | 32% | 0,02 | 9        | 1,1                                      | 3,8                  | 29% | 0,30 | 1,2                                      | 3,8                  | 30% | 41,58               |  |
| 135 | 11          | (0,Rz2)    | 3,00% | 11,65% | 2,31       | 8,93     |                               | 1,2                                      | 3,3                  | 36% | 0,02 | 10       | 1,3                                      | 3,3                  | 39% | 0,38 | 1,3                                      | 3,3                  | 38% | 82,76               |  |
| 136 | 12          | em branco  | 5,00% | 0,00%  | 3,85       | 0        |                               | 1,2                                      | 3,7                  | 32% | 0,00 | 11       | 1,2                                      | 3,7                  | 32% | 0,32 | 1,2                                      | 3,7                  | 32% | 107,48              |  |
| 137 |             |            |       |        |            |          |                               | 1,1                                      | 3,5                  | 31% | 0,01 | 12       | 1,0                                      | 3,4                  | 29% | 0,30 | 1,1                                      | 3,5                  | 30% | 37,69               |  |
| 138 |             |            |       |        |            |          |                               | Surfact.<br>inds                         | 1,7                  | 3,5 | 49%  | 0,01     | Surfact.<br>inds                         | 1,8                  | 3,6 | 50%  | 0,49                                     | 1,8                  | 3,6 | 49%                 |  |
| 139 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 140 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 141 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |
| 142 |             |            |       |        |            |          |                               |  |                      |     |      |          |  |                      |     |      |  |                      |     |                     |  |

**APÊNDICE 2: PLANILHAS COM CÁLCULO DO CUSTO OPERACIONAL (OPEX) DA PLANTA INDUSTRIAL DE SURFACTINA**

| E1 | A  | B                        | C       | D          | E             | F        | G         | H             | I | J | K | L | M | N | O |
|----|--|--------------------------|---------|------------|---------------|----------|-----------|---------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 1  | PROJETO CAPEX OPEX para produção surfactina, baseado nos experimentos de laboratório do projeto: PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR BACILLUS SUBTILIS UTILIZANDO MIX DE BORRA OLEOSA 1:1 DE SOJA E ALGODÃO C |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 2  |  |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 3  |  |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 4  |  |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 5  |  |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 6  | <b>MEIO CULTIVO</b>  | laboratório              |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 7  |  | Peptona Animal           | 50,07 g | 3,0042 g   | 901.260 g     | 901,3 Kg | R\$ 40,00 | R\$ 36.050,40 |   |   |   |   |   |   |   |
| 8  |  | Extrato de Carne         | 15,06 g | 0,9036 g   | 271.080 g     | 271,1 Kg | R\$ 40,00 | R\$ 10.843,20 |   |   |   |   |   |   |   |
| 9  |  | Extrato de Levedura      | 15,12 g | 0,9072 g   | 272.160 g     | 272,2 Kg | R\$ 20,00 | R\$ 5.443,20  |   |   |   |   |   |   |   |
| 10 |  | Cloreto de Sódio         | 50,37 g | 3,0222 g   | 906.660 g     | 906,7 Kg | R\$ 1,00  | R\$ 906,66    |   |   |   |   |   |   |   |
| 11 |  | Água                     | 1000 mL | 60 mL      | 18.000.000 mL | 18.000 L | R\$ 0,10  | R\$ 1.800,00  |   |   |   |   |   |   |   |
| 12 | <b>ESTERILIZAR</b>   |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 13 |  | criotubos com B Subtilis | 8 mL    | 0,48 mL    | 144.000 mL    | 144 L    | R\$ 10,00 | R\$ 1.440,00  |   |   |   |   |   |   |   |
| 14 |  | Condições: 200RPM,       |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 15 |  | 37,4 C, 24h              |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 16 | <b>FERMENTAÇÃO</b>   |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 17 |  | Preparo 1a solução       |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 18 |  | Fosfato dibásico de      | 27,2 g  | 0,1088 g   | 32.640 g      | 32,6 Kg  | R\$ 20,00 | R\$ 652,80    |   |   |   |   |   |   |   |
| 19 |  | potássio                 | 250 mL  | 1 mL       | 300.000 mL    | 300 L    | R\$ 0,10  | R\$ 30,00     |   |   |   |   |   |   |   |
| 20 |  | água                     |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 21 |  | Preparo 2a solução       |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 22 |  | Sulfato de Amônio        | 0,2 g   | 0,0035 g   | 1050 g        | 1,1 Kg   | R\$ 15,00 | R\$ 15,75     |   |   |   |   |   |   |   |
| 23 |  | Sulfato de Magnésio      | 0,05 g  | 0,000875 g | 262,5 g       | 0,3 Kg   | R\$ 5,00  | R\$ 1,31      |   |   |   |   |   |   |   |
| 24 |  | Hepthidriado             | 200 mL  | 3,5 mL     | 1.050.000 mL  | 1.050 L  | R\$ 0,10  | R\$ 105,00    |   |   |   |   |   |   |   |
| 25 |  | água                     |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 26 |  |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |
| 27 |  |                          |         |            |               |          |           |               |   |   |   |   |   |   |   |

|    | A  | B  | C        | D             | E        | F | G | H | I | J              | K                     | L                   | M | N | O |
|----|--|--|----------|---------------|----------|---|---|---|---|----------------|-----------------------|---------------------|---|---|---|
| 27 |  |  |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |
| 28 |  | <b>Preparo 3a solução (sol. Estoque)</b> |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |
| 29 | água   | 100 mL                                   | 12 mL    | 3.600.000 mL  | 3.600 L  |   |   |   |   | R\$ 0,10       | R\$ 360,00            |                     |   |   |   |
| 30 | EDTA   | 0,01 g                                   | 0,0012 g | 360 g         | 0,4 Kg   |   |   |   |   | R\$ 40,00      | R\$ 14,40             |                     |   |   |   |
| 31 | Sulfato de Mangânes                          | 0,30 g                                   | 0,036 g  | 10.800 g      | 10,8 Kg  |   |   |   |   | R\$ 25,00      | R\$ 270,00            |                     |   |   |   |
| 32 | Sulfato de Ferro Heptahidratado              | 0,01 g                                   | 0,0012 g | 360 g         | 0,4 Kg   |   |   |   |   | R\$ 40,00      | R\$ 14,40             |                     |   |   |   |
| 33 | Cloreto de Cálcio                            | 0,01 g                                   | 0,0012 g | 360 g         | 0,4 Kg   |   |   |   |   | R\$ 40,00      | R\$ 14,40             |                     |   |   |   |
| 34 | Cloreto de Cobalto Hexahidratado             | 0,01 g                                   | 0,0012 g | 360 g         | 0,4 Kg   |   |   |   |   | R\$ 40,00      | R\$ 14,40             |                     |   |   |   |
| 35 | Sulfato de Zinco Heptahidratado              | 0,01 g                                   | 0,0012 g | 360 g         | 0,4 Kg   |   |   |   |   | R\$ 40,00      | R\$ 14,40             |                     |   |   |   |
| 36 | medir pH                                     |  |          |               |          |   |   |   |   | <b>sub tot</b> | <b>R\$ 702,00</b>     |                     |   |   |   |
| 37 | 2M (caso necessário) corrigir p 7,0 com NaOH |  |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |
| 38 | borra  |  | 4,62 g   | 1.386.000 g   | 1,386 Kg |   |   |   |   | R\$ 1,00       | R\$ 1,386,00          |                     |   |   |   |
| 39 | glicose                                      |  | 2,31 g   | 693.000 g     | 693 Kg   |   |   |   |   | R\$ 10,00      | R\$ 6.930,00          |                     |   |   |   |
| 40 | Condições: 200RPM, 37,4 C, 24h               |  |          |               |          |   |   |   |   | <b>sub tot</b> | <b>R\$ 8.316,00</b>   |                     |   |   |   |
| 41 |  |  |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |
| 42 | HCl 3M                                       |  | 20 mL    | 6.000.000 mL  | 6.000 L  |   |   |   |   | R\$ 0,50       | R\$ 3.000,00          |                     |   |   |   |
| 43 | NaOH 1M                                      |  | 50 mL    | 15.000.000 mL | 15.000 L |   |   |   |   | R\$ 1,00       | R\$ 15.000,00         |                     |   |   |   |
| 44 | Clorofórmio                                  |  | 4 mL     | 1.200.000 mL  | 1.200 L  |   |   |   |   | R\$ 20,00      | R\$ 24.000,00         |                     |   |   |   |
| 45 | Metanol                                      |  | 2 mL     | 600.000 mL    | 600 L    |   |   |   |   | R\$ 10,00      | R\$ 6.000,00          |                     |   |   |   |
| 46 |  |  |          |               |          |   |   |   |   | <b>sub tot</b> | <b>R\$ 48.000,00</b>  |                     |   |   |   |
| 47 |  |  |          |               |          |   |   |   |   | <b>TOTAL</b>   | <b>R\$ 114.306,32</b> | <b>\$ 20.782,97</b> |   |   |   |
| 48 |  |  |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |
| 49 |  |  |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |
| 50 |  |  |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |
| 51 |  |  |          |               |          |   |   |   |   |                |                       |                     |   |   |   |

**APÊNDICE 3: PLANILHA COM RELAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS QUE COMPÕE A PLANTA INDUSTRIAL DE SURFACTINA.**

|     | B                         | C     | D            | E           | F          | G             | H            | I        | J       | K              | L          | M      | N       | O    | P     |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
|-----|---------------------------|-------|--------------|-------------|------------|---------------|--------------|----------|---------|----------------|------------|--------|---------|------|-------|------------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------------|-----|
| B53 | EQUIPAMENTO               |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 54  | TAG                       | T-01  | reator       | centrífuga  | tanque     | T-02          | tanque       | T-03     | tanque  | T-04           | tanque     | T-05   | tanque  | B-01 | bomba | B-02       | bomba | B-03 | bomba | B-04 | bomba | B-05  | bomba | E-01  | evaporador |     |
| 55  | PRODUTO NO EQUIPAM.       |       | micronutr.   | fermentação | fermentado | tq pós reator | acidificação | HCl 3M   | NaOH 1M | Clorof. / MeOH | prep soluç | reator | centrif | HCl  | NaOH  | surfactina |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 56  | CAPACIDADE (m3) ou (m3/h) | 4     | 50           | 5           | 50         | 6             | 6            | 15       | 2       | 7              | 50         | 12     | 9       | 15   | 6     |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 57  | MATERIAL                  | ferro | ferro        | inox        | ferro      | inox          | inox         | fibra v. | ferro   | ferro          | ferro      | inox   | inox    | inox | ferro | ferro      | ferro | inox | inox  | inox | ferro | ferro | ferro | ferro | ferro      |     |
| 58  | AGITADOR (rpm)            | 50    | 200          | 5.000       | X          | 50            | X            | X        | X       | X              | X          | X      | X       | X    | X     | X          | X     | X    | X     | X    | X     | X     | X     | X     | X          |     |
| 59  | ENCAMISAMENTO             | X     | sim          | sim         | X          | sim           | sim          | X        | X       | X              | X          | X      | X       | X    | X     | X          | X     | X    | X     | X    | X     | X     | X     | sim   | sim        |     |
| 60  | PRODUTO NA CAMISA         | X     | vapor / água | ágelada     | X          | ágelada       | X            | X        | X       | X              | X          | X      | X       | X    | X     | X          | X     | X    | X     | X    | X     | X     | X     | X     | vapor      |     |
| 61  | TERMOPAR                  | X     | sim          | sim         | sim        | sim           | sim          | sim      | sim     | sim            | sim        | sim    | sim     | sim  | sim   | sim        | sim   | sim  | sim   | sim  | sim   | sim   | sim   | sim   | sim        |     |
| 62  | PHMETRO                   | X     | sim          | sim         | X          | sim           | sim          | X        | X       | X              | X          | X      | X       | X    | X     | X          | X     | X    | X     | X    | X     | X     | X     | X     | X          |     |
| 63  | TEMP. OP. ( C )           | amb   | 38           | 4           | amb        | 4             | amb          | amb      | amb     | amb            | amb        | amb    | amb     | amb  | amb   | 38         | 10    | 4    | 4     | 4    | 4     | 4     | 4     | 60    | 60         |     |
| 64  | PRESS. OP. (psig)         | amb   | amb          | amb         | amb        | amb           | amb          | amb      | amb     | amb            | amb        | amb    | amb     | amb  | amb   | 10         | 10    | 10   | 10    | 10   | 10    | 10    | 10    | 10    | amb        | amb |
| 65  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 66  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 67  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 68  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 69  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 70  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 71  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 72  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 73  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 74  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 75  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |
| 76  |                           |       |              |             |            |               |              |          |         |                |            |        |         |      |       |            |       |      |       |      |       |       |       |       |            |     |

#### **APÊNDICE 4: PRODUÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA**

**Produção de biosurfactantes utilizando como substrato resíduos do refino do processamento de oleaginosas – uma revisão.**

IV SIINTEC – Simpósio Internacional de Tecnologia de Inovação e Tecnologia.

VIII PTI 2018 – Work Shop de Pesquisa, Tecnologia e Inovação.

Novembro, 2018 - ISSN 2447-4215

SENAI CIMATEC, Salvador - BA

**Preliminary evaluation use of lees generated in the refining vegetable oil mixture as a substrate for the production of biosurfactant.**

5<sup>th</sup> Latin American Congress on Biorefineries

January, 2019, Concepcion, Chile

**Avaliação da borra oriunda do resíduo do refino do processamento de oleaginosas para utilização como substrato para produção de biosurfactantes.**

IV SAPCT – Seminário de Avaliação de Pesquisa Científica e Tecnológica.

Maior, 2019.

SENAI CIMATEC, Salvador – BA

**Produção de biosurfactantes utilizando como substrato resíduos do refino do processamento de oleaginosas – uma revisão.**

Ciência, Tecnologia e Inovação: Desafio para um Mundo Global.

Atena Editora, 2019. Cap 1, p. 1-8. DOI 10.22533/at.ed.0131929071

**O Case Sunew analisado na ótica Neo- Schumpeteriana.**

Ciência, Tecnologia e Inovação: Desafio para um Mundo Global.

Atena Editora, 2019. Cap 11, p. 79-86. DOI 10.22533/at.ed.0131929071

**Study Biosurfactant Production, by *Bacillus subtilis*, from the Combination of Vegetable Oil Refining Lees and Glucose.**

Journal of Bioengineering and Technology Applied to Health

Received 08, 2019; revised 09, 2019; accepted 10, 2019

Webpage: www.jbth.com.br - ISSN:2595-2137

**Estudo da produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis*, à partir da combinação da borra de refino de óleo vegetal e glicose.**

V SIINTEC - Simpósio Internacional de Inovação e Tecnologia

Novembro, 2019. vol. 6 num. 3 - ISSN:2357-7592

SENAI CIMATEC, Salvador – BA

**Agro-industrial waste with potential use as a substrate in the production of biosurfactant.**

VI International Symposium on Innovation and Technology (VI SIINTEC)

Outubro, 2020 ISSN: 2357-7592

SENAI CIMATEC, Salvador – BA

**Production of biosurfactants by fermentation process using waste as substrate – a patent review.**

VII International Symposium on Innovation and Technology (VII SIINTEC)

Outubro, 2021 ISSN: 2357-7592 , SENAI CIMATEC, Salvador – BA

**Produção de Surfactina por *B. subtilis* Empregando Borra Oleosa como Substrato**

Artigo submetido no mês Maio/2022, revisado em Setembro/2022 e aceito para publicação em Outubro/2022. Em abril/2023 em editoração na: Revista Virtual de Química – publicação Qualis B.