



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DO SORO DE LEITE

Vanêssa Ribeiro Nogueira

Orientadora: Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Dezembro/ 2015

PRODUÇÃO DE BLOSSURFACTANTE A PARTIR DO SORO DE LEITE

Vanêssa Ribeiro Nogueira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del-Rei.

Orientadora: Sandra de Cássia Dias

Ouro Branco

Dezembro/ 2015

RESUMO

Surfactantes são agentes que reduzem as tensões superficiais e interfaciais dos líquidos, os mais utilizados possuem origem dos derivados de petróleo. Quando produzidos por microrganismos, os surfactantes recebem a denominação de biossurfactantes, e possuem vantagens como baixa toxicidade e biodegradabilidade. Podem ser empregados na área ambiental, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos devido a propriedades como emulsificação e solubilização. A produção de um biossurfactante apresenta um baixo rendimento, o que torna o produto caro e desvantajoso em comparação com os de origem petroquímica. A utilização de resíduos agroindustriais pode contribuir para a redução dos custos na produção de biossurfactantes, como opção pode ser empregado o soro de leite, que possui elevado teor de lactose, proteínas e sais minerais presentes em sua composição. O objetivo deste trabalho foi determinar a influência da concentração do soro de leite e da temperatura na produção de biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 6633 através de um delineamento composto central rotacional. A concentração do soro de leite foi a única variável estatisticamente significativa, não havendo interação com a temperatura. A produção de biossurfactante não foi favorecida pela utilização do soro de leite puro, entretanto a utilização do meio Cooper diminuiu significativamente a tensão superficial, apresentou melhor índice de emulsificação e maior produção do biossurfactante.

Palavras-chave: Biossurfactante; soro de leite; *Bacillus subtilis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das forças atrativas das moléculas no interior e na superfície de um líquido. Fonte: ALHANATI, 2015	8
Figura 2. Estrutura da surfactina. Fonte: MEDEIROS et al., 2011	13
Figura 3. Estrutura da iturina-A. Fonte: EUROASIAN CHEMICALS PVT. LTD	14
Figura 4. Estrutura da fengicina. Fonte: MEDEIROS et al., 2011	15
Figura 5. Redução da tensão superficial dos cultivos realizados utilizando o DCCR conforme a Tabela 1	22
Figura 6. Diagrama de Pareto, análise das variáveis soro e temperatura	24
Figura 7. Curva de contorno da redução da tensão superficial em função da temperatura e diferentes concentrações de soro. F calculado (9,54) > F tabelado (5; 5; 0,05) = 5,05, utilizando a ANOVA	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental DCCR, valores codificados e originais das variáveis de estudo (temperatura e concentração de soro)	18
Tabela 2. Tensões superficiais dos meios livres de células	20
Tabela 3. Tensões superficiais dos meios de cultivo para cada ensaio em duplicata	21
Tabela 4. Índice de emulsificação em duplicata das amostras dos ensaios	25
Tabela 5. Concentração do precipitado em cada um dos ensaios no tempo de 12 horas	26
Tabela 6. Tensões superficiais para meio Cooper e para meio Cooper e soro de leite 50%	28
Tabela 7. Concentração do precipitado para o ensaio contendo apenas meio Cooper	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	8
2.1	Objetivo Geral	8
2.2	Objetivos Específicos	8
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1	Tensão Superficial e tensão Interfacial	8
3.2	<i>Bacillus subtilis</i>	9
3.3	Surfactantes	9
3.4	Biossurfactantes	10
3.5	Classificação dos Biossurfactantes	11
3.6	Principais Lipopeptídeos Sintetizados por <i>Bacillus subtilis</i>	13
3.6.1	Surfactina	13
3.6.2	Iturina	14
3.6.3	Fengicina	15
3.7	Resíduos Agroindustriais como Substratos Alternativos	16
3.8	Soro de Leite	16
4	METODOLOGIA	17
4.1	Preparo dos Criotubos	17
4.2	Pré-inóculo	17
4.3	Inóculo	17
4.4	Cultivos	18
4.5	Determinação da Tensão Superficial	18
4.6	Índice de Emulsificação (IE)	19
4.7	Precipitação do Biossurfactante	19
4.8	Caracterização do Soro de Leite	19
4.8.1	Dosagem da lactose	19
4.8.2	Dosagem de ácido graxo total	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
6	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são agentes de atividade superficial, que possuem a capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais dos líquidos. Os surfactantes mais utilizados são originados a partir dos derivados de petróleo. Devido à crescente preocupação ambiental, a utilização de surfactantes naturais produzidos por microrganismos é uma alternativa. Esses surfactantes recebem a denominação de biossurfactantes, e possuem vantagens como baixa toxicidade e biodegradabilidade (AL-ARAJI et al., 2007; BARROS et al., 2007).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, essa característica permite o acúmulo nas interfaces, a formação de micelas, a redução da tensão superficial e como consequência o aumento da solubilidade de compostos com baixa solubilidade em água (AL-ARAJI et al., 2007). Entre as propriedades dos biossurfactantes estão a emulsificação, capacidade espumante, dispersão de fases e a solubilização, que vão permitir sua aplicabilidade em diferentes áreas: ambiental através da biorremediação; indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos (BARROS et al., 2008).

Os biossurfactantes são classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e lipossacarídeos. O mais eficiente desses são os lipopeptídeos, geralmente, constituídos por ácidos graxos ligados a peptídeos de carga negativa ou neutra, dependendo do pH, com os aminoácidos dispostos em forma cíclica. Entre os lipopeptídeos mais conhecidos está a surfactina produzida pelo microrganismo *Bacillus subtilis* (BARROS et al., 2007).

A composição e o rendimento do biossurfactante depende de alguns fatores como temperatura do cultivo, pH e composição do meio (COLLA; COSTA, 2003). Por ser um processo que tem baixo rendimento, a produção de biossurfactante apresenta um custo elevado, o que o torna desvantajoso em relação aos surfactantes de origem petroquímica. Como a matéria-prima pode representar até 30% dos custos, uma alternativa para redução de custos é o emprego de resíduos agroindustriais em meios de cultura para a produção de biossurfactantes, já que possuem elevado conteúdo de lipídeos e carboidratos (BARROS et al., 2007).

Dentre os resíduos agroindustriais, o soro de leite é uma opção considerável, pelo alto teor de lactose, proteínas e sais minerais presentes em sua composição, que fornece um meio de cultura enriquecido. A produção diária do soro de leite é

elevada e seu descarte acarreta em impacto ambiental, estimulando o seu reaproveitamento (NITSCHKE et al., 2001). Logo, a utilização do soro de leite pode permitir uma produção de biossurfactante mais barata e com menores consequências ambientais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir biossurfactante utilizando lactose como fonte de carbono.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) a melhor temperatura e concentração do soro de leite para a produção de um biossurfactante utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tensão Superficial e Tensão Interfacial

Tensão superficial corresponde ao aumento das forças atrativas intermoleculares que ocorrem na superfície de um líquido. As moléculas no interior de um líquido sofrem a ação de forças coesivas com uma resultante nula, enquanto as presentes na superfície possuem uma resultante diferente de zero, já que a atração com as moléculas de ar é considerada desprezível, ocorrendo apenas forças atrativas entre as moléculas da superfície e vizinhas do líquido, que formará uma espécie de membrana elástica, como mostra a Figura 1 (ALHANATI, 2015).

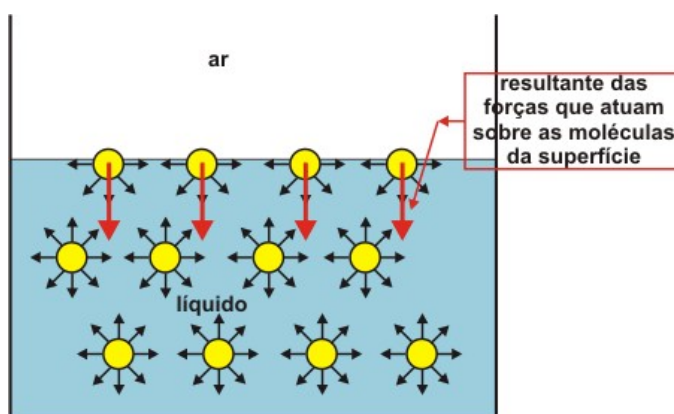


Figura 1. Representação das forças atrativas das moléculas no interior e na superfície de um líquido. Fonte: ALHANATI, 2015.

A diferença entre tensão superficial e interfacial é definida pelos fluidos presentes, quando um dos fluidos é a fase vapor recebe a denominação de tensão superficial, e se a tensão ocorre entre líquidos imiscíveis corresponde à tensão interfacial (FERNANDES, 2006).

3.2 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria gram positiva, aeróbica, encontrada no solo, não patogênica, formadora de esporos, não colonizadora de tecidos (PACCEZ, 2007). As colônias são irregulares, com contorno ondulado ou filamentosos, apresentam consistência cremosa e o diâmetro varia de 2 a 4 mm, já em cultivos mais velhos, o aspecto das colônias é seco e rugoso e tendem a incrustar no ágar (GOMES, 2013).

Isolados de *Bacillus subtilis* sintetizam uma variedade de metabólitos antifúngicos, como os seguintes lipopeptídeos: surfactina, iturina e fengicina. Esses peptídeos são cíclicos compostos por 7 ou 10 α -aminoácidos associados a β -hidróxi ácido graxo (surfactinas e fengicinas) ou a β -amino ácido graxo (iturina) (FILHO et al., 2010).

Linhagens desta espécie já são utilizadas para produção de proteases secretadas, com aplicação na indústria de detergentes, sabão em pó e para fins laboratoriais ou industriais (PACCEZ, 2007). Também vem sendo usada comercialmente para o controle de enfermidades de plantas e para o aumento da produtividade de culturas (FILHO et al., 2010).

3.3 Surfactantes

Surfactantes são agentes de superfície ativos que substituem moléculas de alta energia nas interfaces, assim reduzem a energia livre do sistema e, como consequência, diminuem as tensões superficiais e interfaciais dos líquidos. As moléculas de surfactantes são anfipáticas, sua porção hidrofóbica é constituída por uma cadeia hidrocarbonada e a porção hidrofílica pode ser iônica, não iônica ou anfotérica (FELIX, 2012).

Um surfactante é reconhecido como eficiente através da sua capacidade em reduzir a tensão superficial, considerada a quantidade de energia livre da superfície por unidade de área necessária para retirar uma molécula do interior do líquido em

direção à superfície (PIRÔLLO, 2006). Os surfactantes conseguem reduzir a tensão superficial da água de 72,0 para 27,0 mN/m (AL-ARAJI et al., 2007) e a interfacial entre água e n-hexadecano de 40,0 para 1,0 mN/m (PIRÔLLO, 2006).

Outra característica dos surfactantes é a capacidade de formar micelas em baixas concentrações em água (BARROS et al., 2007). A concentração micelar crítica (CMC) pode ser definida como a concentração mínima de tensoativo para alcançar os valores mais baixos de tensões superficiais e interfaciais, que vai iniciar a formação das micelas (PIRÔLLO, 2006).

Devido as suas características, os surfactantes possuem propriedades como emulsificação, detergência, solubilização, dispersão de fases, capacidade espumante e molhante (BARROS et al., 2007), o que permite sua aplicação em diversas indústrias como petroquímicas, de alimentos, farmacêutica, de cosméticos, entre outras (BARROS et al., 2008). Geralmente, os surfactantes são sintetizados quimicamente através de derivados do petróleo, por isso sua produção, seus subprodutos e sua difícil degradabilidade acarretam riscos ambientais (FELIX, 2012). E, a toxicidade está relacionada à presença de cadeias carbônicas ramificadas com mais de 16 átomos de carbono ou pela existência de anéis aromáticos (ACIOLY, 2009).

3.4 Biosurfactantes

Biosurfactantes, surfactantes naturais, são subprodutos metabólicos de origem microbiana com características e propriedades semelhantes aos surfactantes sintéticos (FELIX, 2012). A estrutura, geralmente, apresenta uma porção hidrofílica constituída de aminoácidos ou peptídeos ou polissacarídeos e a porção hidrofóbica é composta por uma cadeia de ácidos graxos saturados ou não (PIRÔLLO, 2006).

Após a síntese, os biosurfactantes são excretados para o meio ou permanecem na superfície celular microbiana para auxiliar no transporte de substratos insolúveis pela membrana. Quando liberados emulsionam e solubilizam hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, o que vai permitir o crescimento em substratos apolares, e ainda, influenciam a adesão celular à superfície (FELIX, 2012).

Os biosurfactantes apresentam vantagens como baixa toxicidade, biodegradabilidade, maior atividade superficial e interfacial, maior estabilidade a

valores extremos de temperatura e pH. Os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e existe a possibilidade da mudança na estrutura através da manipulação genética, química e biológica dos organismos sintetizadores (LIMA JUNIOR, 2012).

São produzidos por processos fermentativos que utilizam substratos de baixo custo como açúcares, resíduos agrícolas e industriais, alcanos e óleos. Mas, a sua produção apresenta um alto custo devido à baixa produtividade e a utilização de métodos ineficientes de recuperação do produto. Além disso, existem desvantagens que estão associadas à armazenagem, a padronização e a utilização de solventes no processo de extração. Como o meio de cultivo é responsável por até 30% do custo do produto, uma opção é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato. O reaproveitamento dos resíduos deve considerar a seleção de um substrato que possa fornecer um balanço correto de nutrientes para garantir o crescimento celular e a produção da substância de interesse (ACIOLY, 2009). Alguns parâmetros influenciam o processo de produção do biossurfactante são eles: a natureza da fonte de carbono; concentrações de nitrogênio, fósforo, ferro e manganês; aeração; agitação; geração de espuma; temperatura e pH (PIRÔLLO, 2006).

Os biossurfactantes podem ser empregados como dispersantes na indústria de cosméticos e de alimentos. Na medicina como agentes antimicrobianos, antivirais e antitumorais, e devido a sua propriedade antiadesiva podem impedir a formação de biofilmes em materiais hospitalares. Em nanotecnologia, são empregados como agentes de superfície na dispersão de nanotubos de carbono. Na indústria petrolífera, são incorporados aos óleos lubrificantes ou utilizados na recuperação do petróleo. Podem ser empregados também para biorremediação e dispersão em derramamentos de óleo e na remoção de metais pesados, como o cromo, do solo e da água (CONTIERO et al., 2012; FELIX, 2012).

3.5 Classificação dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua origem microbiana ou pela composição química, já que apresentam moléculas complexas de diferentes compostos químicos como peptídeos, ácidos graxos, glicolipídeos e fosfolipídeos (AL-ARAJI et al., 2007).

Os glicolipídeos são constituídos por moléculas de carboidratos, que pode ser glicose, galactose, manose ou ramnose, combinados com ácidos graxos de cadeia longa. Os biossurfactantes mais conhecidos dessa classe são os ramnolipídeos produzidos por diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, os trealolipídeos sintetizados por espécies de *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium*, e os soforolipídeos produzidos por diversas leveduras do gênero *Candida*, que se destaca por manter suas propriedades tensoativas em condições extremas de temperatura, pH e NaCl (FELIX, 2012).

Os lipopeptídeos e lipoproteínas são compostos caracterizados por peptídeos ligados a ácidos graxos, onde os aminoácidos estão dispostos em forma cíclica e a porção proteica pode ser aniônica ou neutra. Os principais exemplos de biossurfactantes dessa classe são a surfactina, fengicina, iturina, liquenisina e bacilomicina, que são reconhecidos por sua atividade antibiótica e são sintetizados por bactérias do gênero *Bacillus* (BARROS et al., 2007).

Os fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros são produzidos por leveduras e bactérias que utilizam n-alcenos como fonte de carbono e energia para o crescimento. Um exemplo, a fosfatidiletolamina é sintetizada por culturas de *Acinetobacter* sp que pode promover a formação de microemulsões de alcano na água (ACIOLY, 2009).

Os polímericos ou lipopolissacarídeos são caracterizados por ácidos graxos e polissacarídeos que estão ligados de forma covalente. Entre os mais conhecidos está o emulsan, sintetizado por *Acinetobacter calcoaceticus*, considerado um emulsificante eficiente e foi o primeiro biossurfactante produzido e comercializado em larga escala. Outro exemplo, o liposan, produzido por *Candida lipolytica*, é um emulsificante extracelular constituído por cerca de 80% de carboidratos e o restante de proteínas (FELIX, 2012).

Os biossurfactantes classificados como particulados são células microbianas e vesículas extracelulares que possuem atividade tensoativa, alguns exemplos são *Staphylococcus aureus*, *Serratia* sp e *Acinetobacter* sp, ao crescerem em meio com hexadecano são capazes de produzir vesículas extracelulares, cuja função está associada a captar alcenos para a célula (FELIX, 2012).

A classificação dos biossurfactantes podem ocorrer de acordo com a massa molar como alta ou baixa, sendo os glicolipídeos e os lipopeptídeos considerados de

baixa massa molar, mas são mais eficientes para reduzir a tensão superficial, enquanto os lipopolissacarídeos, polissacarídeos, lipoproteínas são de alta massa molar e mais eficientes na estabilização de emulsões óleo em água (FELIX, 2012).

3.6 Principais Lipopeptídeos Sintetizados por *Bacillus subtilis*

3.6.1 Surfactina

A surfactina é um lipopeptídeo cuja porção hidrofílica é composta por um heptapeptídeo (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) disposto em um anel peptídico do tipo lactona e a porção hidrofóbica é caracterizada por cadeia de ácido graxo β -hidróxi, contendo de 13 a 15 átomos de carbono (ZHANG et al., 2014), a sua estrutura é apresentada na Figura 2.

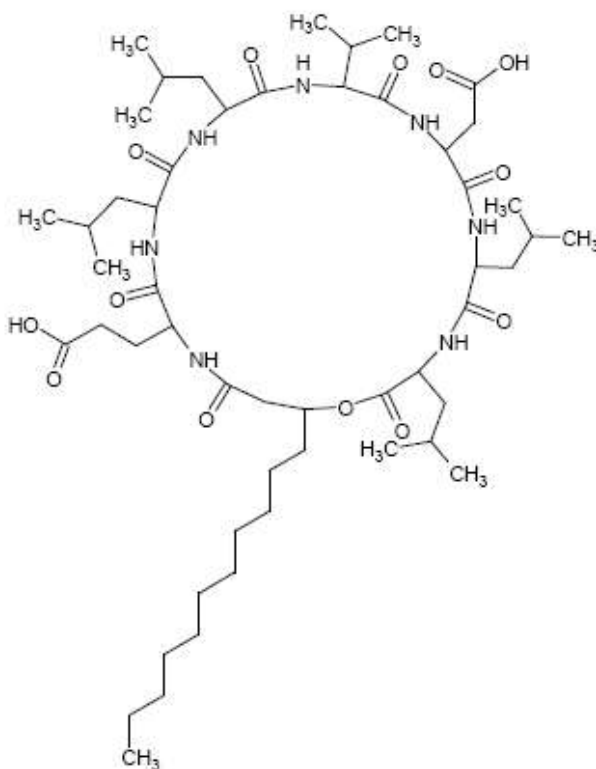


Figura 2. Estrutura da surfactina. Fonte: MEDEIROS et al., 2011.

Existem três surfactinas, A, B e C, que se diferenciam pelas propriedades físico-químicas, variações no tamanho da cadeia, substituições de aminoácidos no anel e a ligação do hidróxi ácido graxo. Essas variações ocorrem pelo tipo de linhagem e devido às condições nutricionais e ambientais (BARROS et al., 2007).

A surfactina possui uma excelente atividade superficial podendo reduzir a tensão superficial da água de 72,0 para 27,0 mN/m à 20°C em concentrações menores que 20 μ M e do sistema água/hexadecano de 43,0 para valores abaixo de 1,0 mN/m. Apresenta ainda maior capacidade de redução da tensão superficial e interfacial e possui menores valores de concentração micelar crítica ao ser comparada com surfactantes sintéticos como brometo de trimetil amônio (BTA) e dodecilsulfato de sódio (SDS) (BARROS et al., 2007).

3.6.2 Iturina

A iturina é um lipopeptídeo em que a parte hidrofílica é caracterizada por um heptapeptídeo (Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Ser) e a porção hidrofóbica possui cadeia de ácido graxo β -amino, contendo de 13 a 17 átomos de carbono, como mostrado na Figura 3 (BUGAY, 2009).

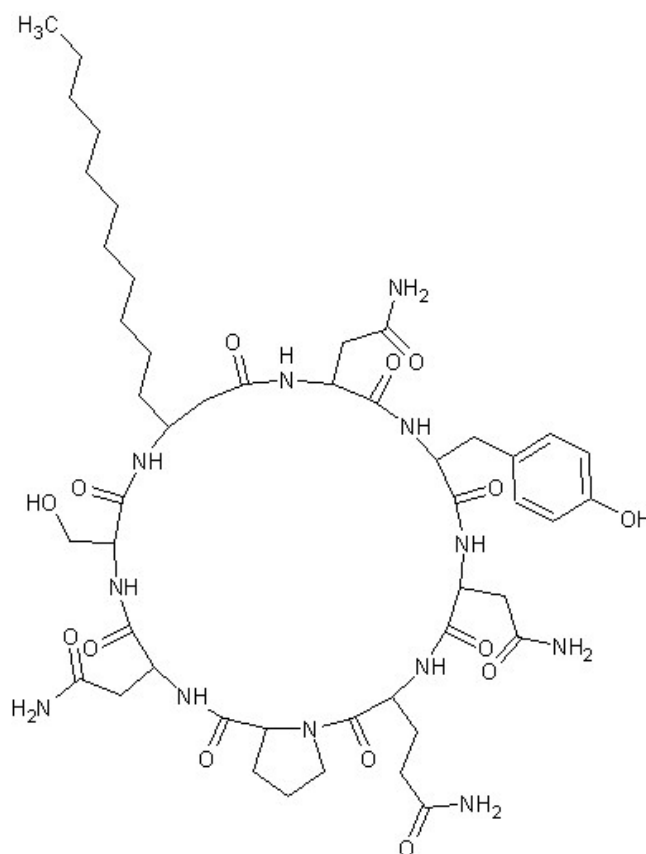


Figura 3. Estrutura da iturina-A. Fonte: EUROASIAN CHEMICALS PVT. LTD.

Existem diferentes isoformas da iturina que diferem pelo comprimento da cadeia carbônica e pelas cadeias laterais (SOUSA, 2012). As principais formas conhecidas são: A, B, micosubtilisina e as bacilomicinas D, F e L (BUGAY, 2009). A

iturina A é considerada um eficaz agente antifúngico para micoses profundas, enquanto as bacilomicinas D e L possuem atividade antimicrobiana (FERNANDES, 2006).

3.6.3 Fengicina

A fengicina apresenta duas isoformas principais que se diferenciam por um aminoácido. Em ambas, a estrutura é formada por um ácido graxo β -hidróxi com cadeia de 13 a 18 átomos de carbono ligado a uma porção composta por 10 aminoácidos, sendo que 8 estão em ciclo (BUGAY, 2009), como mostrado na Figura 4.

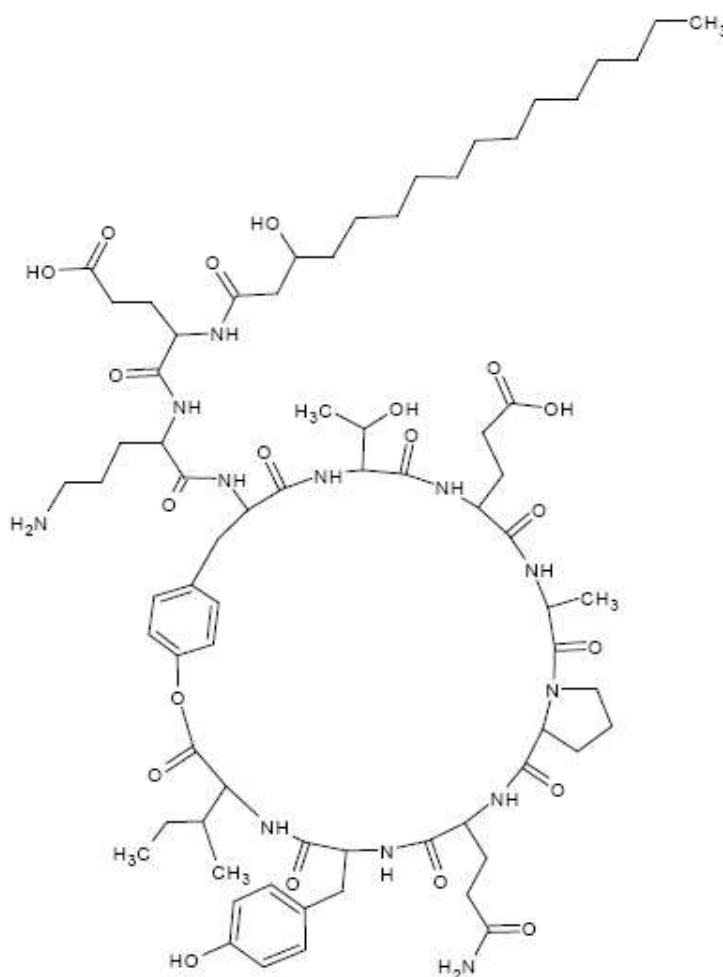


Figura 4. Estrutura da fengicina. Fonte: MEDEIROS et al., 2011.

A isoforma A é composta por L-Glu---D-Orn---D-Tyr---D-*allo*-Thr---L-Glu---D-Ala---L-Pro---L-Gln---L-Tyr---L-Ile, já na B ocorre substituição de D-Ala por D-Val. A

fengicina é ineficaz para leveduras e bactérias, mas possui atividade surfactante e antifúngica consideráveis (BUGAY, 2009).

3.7 Resíduos Agroindustriais como Substratos Alternativos

Em processos biotecnológicos, a matéria-prima pode ser responsável por até 30% do custo de produção. Como alternativa, o emprego de resíduos agroindustriais na produção de biossurfactante pode contribuir para a redução da poluição ambiental e para a valorização dos resíduos, que diminuiriam despesas relacionadas ao seu tratamento e eliminação (ACIOLY, 2009 e CONTIERO et al., 2012).

O emprego de resíduos com elevado teor de carboidratos e lipídeos é uma boa opção para a produção do biossurfactante, mas deve ocorrer um correto balanço dos nutrientes para estabelecer condições ideais para o cultivo do microrganismo e produção do biossurfactante (BARROS et al., 2007).

Resíduos das indústrias do processamento de café, das transformadoras de frutas, do processamento de óleo e das fábricas de farinha já foram investigados como possíveis substratos. Para a produção de biossurfactante, a utilização de substratos adicionais, principalmente, resíduos miscíveis em água como o soro de leite, melão e resíduos de destilaria é investigada (ACIOLY, 2009).

3.8 Soro de Leite

O soro de leite, resíduo proveniente da fabricação de queijos, é uma opção de substrato por apresentar elevado teor de lactose e por conter proteínas e sais minerais em sua composição, fornecendo um meio de cultura rico. Este resíduo é obtido de maneira fácil, já que a produção diária de soro de leite é alta e seu descarte provoca problemas ambientais (NITSCHKE et al., 2001).

A composição do soro de leite corresponde a 95% de água, 3,5% de lactose 0,5% de proteínas, 1,0% de ácido láctico, sais minerais e vitaminas (BARBOSA, 2010). O soro representa de 85 a 95% do volume do leite utilizado na produção de queijo. Esse subproduto possui elevada carga orgânica, quando destinado a corpos hídricos apresenta uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 30 a 50 g L⁻¹ e demanda química de oxigênio (DQO) de 50 a 80 g L⁻¹. O impacto ambiental provocado pelo lançamento de 50 mil litros do soro de leite é comparado ao

acarretado pelo lançamento do esgoto doméstico de uma cidade com 25 mil habitantes (SERPA, 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 Preparo dos Criotubos

Células de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foram semeadas em placa de Petri contendo ágar nutriente e incubadas a 37°C por 18 horas. Uma alça do cultivo foi transferida para erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de caldo nutriente e incubado a 30°C, 150 rpm por 12 horas. Logo após, 12 mL do cultivo foram transferidos para erlenmeyer de 500 mL contendo 48 mL de caldo nutriente e incubado novamente a 30°C, 150 rpm por 12 horas. Decorrido o tempo, foram adicionados 10% de glicerol na suspensão de células e agitado, suavemente, para misturar. Criotubos de 2 mL foram utilizados para armazenar as células a -20°C.

4.2 Pré-inóculo

Um criotubo de 2 mL do microrganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi adicionado a um erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de caldo nutriente e incubado a 30 °C, 150 rpm por 8 horas. O pré-inóculo foi preparado para cada um dos ensaios realizados no experimento.

4.3 Inóculo

Foram adicionados 3,6 mL do pré-inóculo em erlenmeyers de 250 mL, contendo 32,4 mL de meio de cultivo conforme apresentado na Tabela 1. O meio Cooper foi composto por Glicose 40,0 g L⁻¹, NH₄NO₃ 4,0 g L⁻¹, Na₂HPO₄ 5,68 g L⁻¹, KH₂PO₄ 4,08 g L⁻¹, MgSO₄7H₂O 0,197 g L⁻¹, EDTANa₂ 0,00150 g L⁻¹, FeSO₄7H₂O 0,00111 g L⁻¹ e CaCl₂ 0,00078 g L⁻¹ (COOPER, et al., 1981). O pH dos meios foi ajustado em 6,8±0,2 antes do início do cultivo. Quando necessário foi utilizado NaOH 5M para ajustar o pH. A temperatura de incubação para cada um dos ensaios está descrita na Tabela 1. A agitação foi de 150 rpm e o tempo de incubação de 12 horas para todos os ensaios.

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental DCCR, valores codificados e originais das variáveis de estudo (temperatura e concentração de soro).

Ensaio	Valores codificados		Valores originais	
	Temperatura	Soro de leite	Temperatura (°C)	Soro de leite (%)
1	-1	-1	32	14,54**
2	-1	+1	32	85,46**
3	+1	-1	38	14,54**
4	+1	+1	38	85,46**
5	-1,41	0	31	50**
6	+1,41	0	39	50**
7	0	-1,41	35	0*
8	0	+1,41	35	100
9	0	0	35	50**
10	0	0	35	50**
11	0	0	35	50**

*Meio Cooper, **Meio Cooper e soro de leite.

4.4 Cultivos

Os cultivos foram realizados em duplicata para cada um dos ensaios apresentados na Tabela 1. Em erlenmeyers de 500 mL, foram adicionados 117 mL de meio e 13 mL de inóculo. Cada cultivo foi realizado por 48 horas, sendo retiradas amostras de 12 em 12 horas. A rotação foi de 150 rpm para todos os ensaios.

4.5 Determinação da Tensão Superficial

Amostras do cultivo foram retiradas e centrifugadas por 30 minutos a 4000 rpm para separar as células do meio. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi armazenado para medida da tensão superficial, índice de emulsificação e extração do biossurfactante, e o pellet descartado.

Com o auxílio do tensiômetro K6 Du Noüy Ring foram realizadas as medidas das tensões superficiais das amostras retiradas durante o cultivo de cada um dos ensaios. Para isso, o equipamento foi calibrado com água destilada, tensão de 72,0 mN/m, e com álcool etílico, tensão de 25,0 mN/m. A redução de tensão superficial para cada ensaio foi determinada utilizando a Equação 1.

Redução TS = TS do mei inicial – TS do meio nos diferentes tempos do cultivo (1)

TS= Tensão superficial (mN/m).

4.6 Índice de Emulsificação (IE)

Em tubos de fundo reto, foram adicionados 2 mL de querosene e 2 mL do sobrenadante obtido após a centrifugação das amostras de cada um dos ensaios. Em seguida, a mistura querosene e sobrenadante foi agitada no Vortex em velocidade máxima durante 2 minutos. As amostras foram mantidas em repouso durante 24 horas. Logo após, com auxílio de uma régua, foram realizadas as medidas da altura total e da altura da camada emulsionada. O índice de emulsificação (IE) foi calculado através da Equação 2.

$$IE (\%) = \frac{HE}{HT} \times 100 \quad (2)$$

HE: Altura da fase emulsionada. HT: Altura total.

4.7 Precipitação do Biossurfactante

Tubos *falcons* vazios foram pesados e devidamente identificados. Em seguida, foram colocados 10 mL do sobrenadante das amostras centrifugadas. O pH foi ajustado para 2,0 utilizando HCl 6M para precipitar o biossurfactante. As amostras acidificadas foram armazenadas por 24 horas a 4°C. Decorrido o tempo, foi realizada a centrifugação por 60 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco na estufa. Ao final, os *falcons* foram pesados novamente para determinar a massa do biossurfactante produzido, através da subtração do novo peso obtido com o peso dos *falcons* vazios.

4.8 Caracterização do Soro de Leite

4.8.1 Dosagem da lactose

A lactose foi quantificada utilizando o trabalho de Abu-Lehia, (1987), com pequenas modificações. As proteínas das amostras foram precipitadas adicionando ácido tricloroacético 25%. A seguir, foi realizada a centrifugação a 14000 rpm por 5 minutos. Um mL do sobrenadante foi transferido para um tubo e adicionado 2,5 mL de uma solução contendo 0,1% fenol, 1% NaOH, 0,1% ácido pícrico e 0,1% de Na₂S₂O₅. Os tubos foram incubados em banho Maria a 100°C durante 2,5 minutos.

A seguir, resfriados e 7,0 mL de água foram adicionados. A absorbância foi medida a 520 nm.

4.8.2 Dosagem de ácido graxo total

A concentração de ácido graxo foi determinada utilizando o método de Röse-Gottlieb (GEA Niro analytical methods), 1,5 mL de amônia foram adicionados a 10 mL de soro de leite e aquecido a 60°C por 15 minutos. A solução foi transferida para um funil de separação e 10 mL de álcool etílico foram adicionados e misturados suavemente. A seguir, foram adicionados 25 mL de éter etílico à mistura contida no funil de separação e agitado durante 1 minuto, o mesmo procedimento foi realizado utilizando 25 mL de éter de petróleo. A mistura foi mantida em repouso durante 2 horas, e a fase etérea separada da fase aquosa. A fase aquosa foi extraída duas vezes com adição de éter etílico e de petróleo. As fases etéreas foram reunidas e evaporadas até peso constante. A massa de ácido graxo presente no soro foi calculada utilizando a Equação 3.

$$\text{ácidos graxos totais (\%)} = \left(\frac{\text{massa final erlenmeyer (g)} - \text{massa erlenmeyer vazio (g)}}{10 \text{ mL}} \right) \times 100$$

(3)

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A redução de tensão superficial é um dos principais parâmetros para avaliar a presença do biossurfactante no meio, assim foram determinados os valores de tensão superficial dos meios de cultivo e das amostras retiradas durante o cultivo.

Os valores de tensão superficial para cada um dos meios de cultivo livres de células são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Tensões superficiais dos meios de cultivo livres de células.

Meio de Cultivo Livre de Células	Tensão Superficial (mN/m)
Meio Cooper	53,5
14,54% (v/v) de soro de leite*	48,1
50% (v/v) de soro de leite*	45,5
85,46% (v/v) de soro de leite*	45,9
100% de soro de leite	44,5

*Meio Cooper e soro de leite.

Os valores obtidos para as tensões superficiais em cada um dos ensaios, nos diferentes tempos do cultivo, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Tensões superficiais dos meios de cultivo para cada ensaio em duplicata.

Ensaio	Tensões Superficiais (mN/m)				
	0h	12h	24h	36h	48h
1A	41,7	32,0	33,5	36,0	35,0
1B	40,9	28,1	32,5	34,2	36,0
2A	45,0	33,8	36,9	36,1	35,2
2B	43,9	33,5	34,9	35,8	34,9
3A	41,9	31,9	32,2	33,8	36,6
3B	42,1	31,7	31,9	34,1	34,9
4A	44,2	37,1	35,1	36,4	35,2
4B	45,0	37,8	35,1	34,8	36,0
5A	42,9	30,0	28,9	31,5	29,5
5B	43,1	30,2	29,9	28,9	31,8
6A	44,1	33,9	33,0	32,9	39,5
6B	44,5	31,1	28,8	27,5	36,0
7A	47,1	30,9	31,1	32,1	32,1
7B	43,5	31,1	31,0	31,9	31,2
8A	45,1	41,5	46,9	52,5	50,0
8B	46,9	39,5	48,5	53,9	49,0
9A	43,7	33,5	33,0	34,1	34,0
9B	43,0	33,9	34,1	34,7	35,8
10A	43,7	33,8	31,9	33,0	33,0
10B	42,9	33,4	33,1	35,6	37,0
11A	43,0	31,8	32,8	34,0	33,9
11B	43,2	32,0	33,5	34,1	34,0

A partir dos valores iniciais de tensão superficial dos meios e dos obtidos para cada uma das amostras retiradas durante o cultivo foi determinada as reduções de tensão superficial utilizando a Equação 1. Em seguida, foi calculada a média para cada um dos ensaios e os resultados foram utilizados para construir o gráfico apresentado na Figura 5.

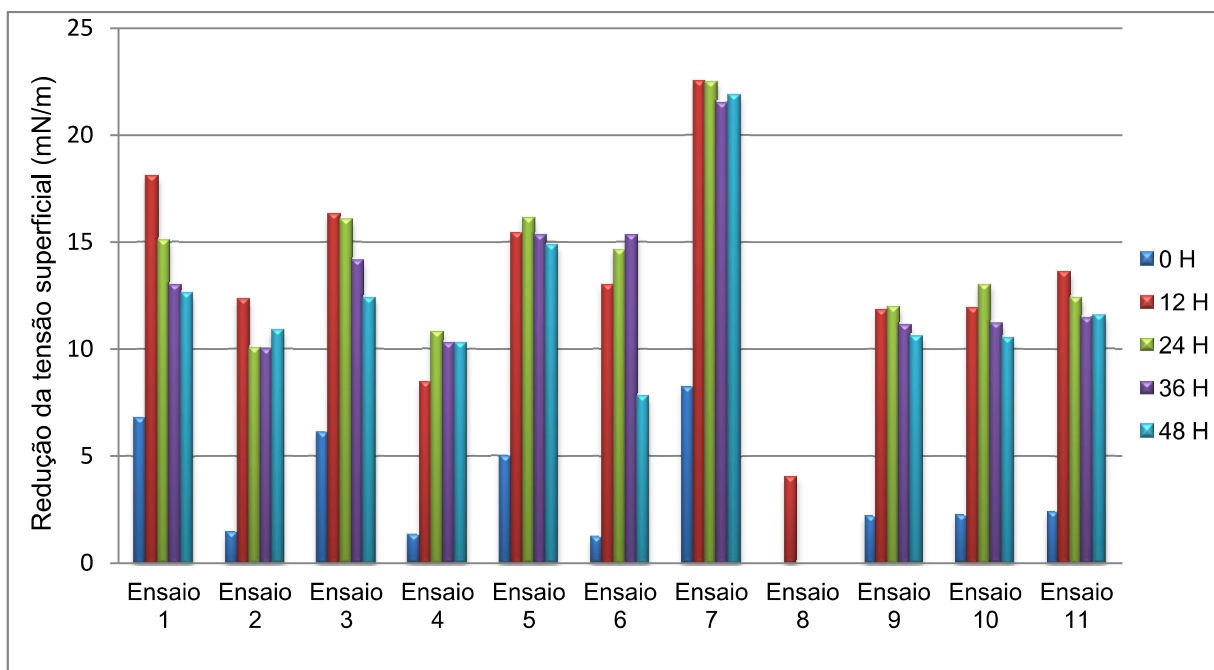


Figura 5. Redução da tensão superficial dos cultivos realizados utilizando o DCCR conforme a Tabela 1.

Através da análise da Figura 5, as maiores reduções de tensão superficial foram observadas nos tempos de 12 e 24 horas em todos os ensaios, exceto o ensaio 8. Isso pode ser explicado pelo biossurfactante ser considerado um metabólito primário, ou seja, é produzido durante a fase exponencial do crescimento celular. Lima Junior (2012) mostrou em seu trabalho que a formação de biomassa foi priorizada no tempo de 12 horas e a produção de surfactina acompanhou o crescimento exponencial do microrganismo nos tempos de 24 e 36 horas, tendo assim comportamento de metabólito primário.

Reduções de tensão superficial foram observadas até no tempo de 0 hora, o que pode ter ocorrido, possivelmente, pelo inóculo empregado ter sido cultivado durante 12 horas, permitindo a presença do biossurfactante nas alíquotas empregadas no início dos cultivos, e como consequência, promovendo reduções da tensão superficial.

A maior redução de tensão superficial foi de 22,5 mN/m, detectada na condição 7 em 12 e 24 horas, essa condição utilizou somente meio Cooper, sendo o cultivo realizado em temperatura de 35°C e 150 rpm. O trabalho de Bugay (2009) mostrou que o *Bacillus subtilis* UFPEDA 456, em cultivos com temperatura de 37°C e 200 rpm, promoveu uma redução de 28,0 mN/m em 24 horas empregando meio

com glicose e sais, e a mesma redução em 12 horas em meio com glicerol e sais. Logo, a redução obtida com o meio Cooper pode ser considerada significativa.

Já a menor redução de tensão superficial foi observada para o ensaio 8, que utilizou apenas soro de leite em cultivo a 35°C e 150 rpm, com redução de 4,0 mN/m. O trabalho de Pereira et al. (2013) mostrou que o uso da lactose como fonte de carbono no meio de cultivo resultou em elevados valores de tensão superficial ao ser comparada com os outros hidratos de carbono testados. O trabalho de Cagri-Mehmetoglu et al. (2012) cita que em alguns estudos o permeado de soro de leite pode ser utilizado como um substrato para a fermentação de *Pseudomonas* sp ou de *Klebsiella oxytoca* para produzir biossurfactantes ramnolipídeos ou polissacarídeos. O autor mostra ainda que são observadas reduções do pH em paralelo ao crescimento do *Bacillus subtilis* devido a formação de ácido láctico a partir da lactose e considera que o microrganismos possui a enzima β -galactosidase responsável em hidrolisar a lactose.

A análise dos dados mostrou que os ensaios com as maiores reduções da tensão superficial, como os ensaios 1 e 3, foram compostos por um maior percentual do meio Cooper na composição do meio, enquanto, as condições com menores reduções, ensaios 2 e 4, possuíram maior composição do soro de leite. Assim, a maior redução da tensão superficial foi determinada pela presença do meio Cooper e não pelo soro de leite nos ensaios que apresentavam diferentes percentuais de soro na composição do meio.

A maior redução de tensão superficial foi observada em 12 horas na maioria dos ensaios, esses dados foram utilizados para avaliar o efeito da concentração do soro e da temperatura na produção de biossurfactante utilizando o programa *Statistica 7®*.

A concentração do soro de leite foi à única variável estatisticamente significativa e não houve interação entre a concentração do soro e temperatura para a produção do biossurfactante, segundo o Diagrama de Pareto, com um intervalo de confiança de 95%, apresentado na Figura 6.

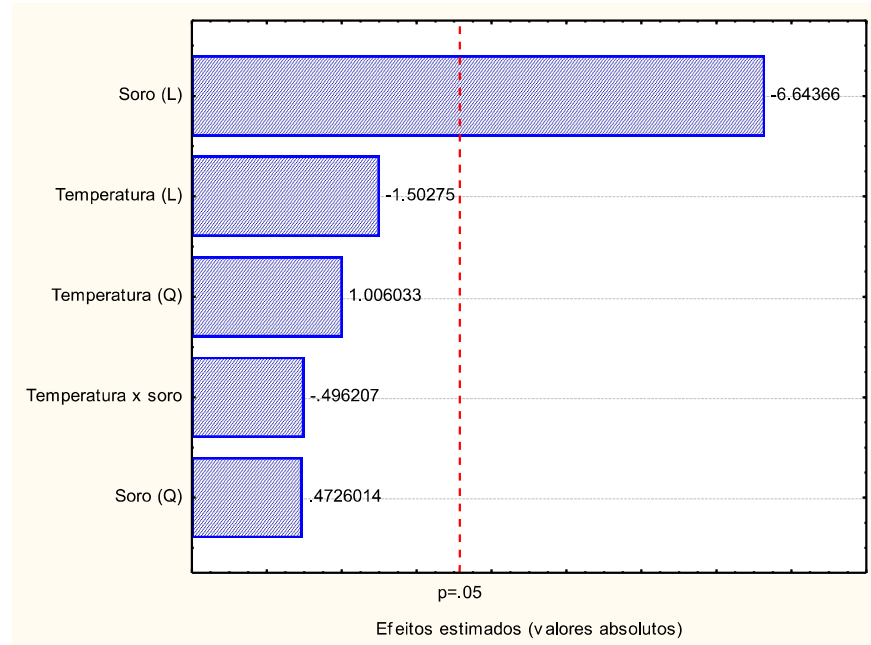


Figura 6. Diagrama de Pareto, análise das variáveis soro e temperatura.

A concentração do soro de leite no meio de cultivo influenciou negativamente a produção do biossurfactante, ou seja, o aumento da concentração do soro diminui a produção do biossurfactante. De acordo com a Figura 7, a maior redução foi de 22,50 mN/m da tensão superficial entre -1,5 e -2,0 para a concentração do soro de leite e nos intervalos de -2,0 a -1,0 e de 1,0 a 2,0 para a temperatura, o que corresponde, aproximadamente, as temperaturas de 31°C e 39°C, respectivamente.

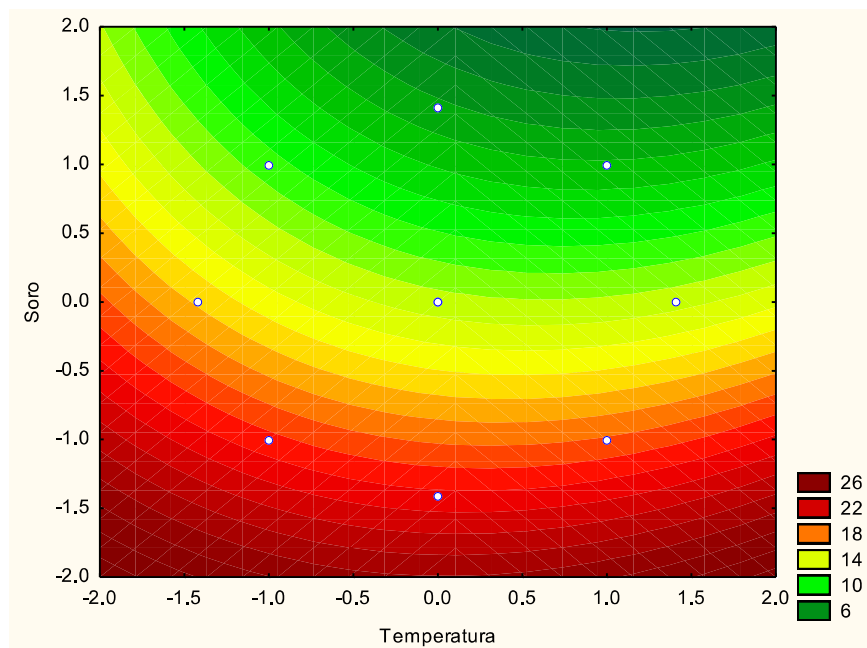


Figura 7. Curva de contorno da redução da tensão superficial em função da temperatura e diferentes concentrações de soro. F calculado (9,54) > F tabelado (5; 5; 0,05) = 5,05, utilizando a ANOVA.

A capacidade de formar emulsões é outra característica de um biossurfactante, assim foi determinado o índice de emulsificação de cada uma das amostras centrifugadas dos 11 ensaios utilizando a Equação 2, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Índice de emulsificação em duplicata das amostras dos ensaios.

Ensaio	Índice de Emulsificação (%)				
	0h	12h	24h	36h	48h
1A	2,27	0,00	0,00	9,09	3,03
1B	4,55	0,00	15,00	20,45	10,00
2A	23,08	20,00	52,50	51,28	46,15
2B	18,18	43,18	40,91	46,15	38,46
3A	0,00	0,00	2,22	5,00	0,00
3B	0,00	0,00	13,33	11,36	0,00
4A	17,50	40,00	48,72	45,00	37,50
4B	20,00	37,50	50,00	48,89	11,11
5A	25,64	5,00	0,00	7,50	5,00
5B	25,64	10,00	5,00	7,50	5,00
6A	5,13	2,56	9,09	9,09	3,03
6B	7,69	3,03	15,15	9,09	6,82
7A	0,00	48,48	42,50	50,00	47,37
7B	15,38	47,37	41,03	51,16	43,18
8A	42,11	18,18	0,00	0,00	0,00
8B	28,21	28,95	0,00	0,00	0,00
9A	7,69	2,50	2,38	12,82	2,27
9B	7,69	2,22	2,27	2,27	2,56
10A	5,13	2,22	12,82	2,56	6,06
10B	10,53	4,55	14,29	35,14	2,63
11A	18,75	2,63	2,50	2,56	10,26
11B	10,26	2,56	2,50	5,41	37,50

Os testes para determinar o índice de emulsificação das amostras empregaram querosene e o tempo de repouso da emulsão formada foi 24 horas. Os maiores valores encontrados foram de, aproximadamente, 50% para o ensaio 7 (apenas meio Cooper). O trabalho de Bugay (2009) mostrou que o *Bacillus subtilis*,

em fermentações com glicose e sais durante 48 horas, apresentou índices de emulsificação menores que 40% empregando gasolina e tolueno e, aproximadamente, zero para o querosene durante 5 horas, após 24 horas, nenhuma das emulsões mantiveram estáveis. Enquanto, a cepa de *Bacillus pumilus*, em fermentações com glicerol e sais durante 12 horas, apresentou índices de emulsificação de 54,5% em 48h de incubação com gasolina. Logo, os valores apresentados para os índices de emulsificação no ensaio 7 foram significativos.

Os ensaios 2 e 4 apresentaram valores consideráveis para o índice de emulsificação. Nesses ensaios a concentração do soro de leite no meio foi de 85,46%, uma possibilidade é a interferência provocada pelos fosfolipídeos do soro presentes no meio. Outra possibilidade é a produção de algum metabólito pelo *Bacillus subtilis* que favoreceu a formação de emulsão. A condição que continha apenas soro de leite no meio de cultivo, ensaio 8, não obteve resultados satisfatórios, assim como os outros ensaios.

Como o tempo de 12 horas foi o que apresentou maior redução da tensão superficial na maioria dos ensaios, essas amostras foram utilizadas para extração do biossurfactante empregando a precipitação ácida, Tabela 5.

Tabela 5. Concentração do precipitado em cada um dos ensaios no tempo de 12 horas.

Ensaio	Concentração do Precipitado no Tempo de 12 Horas (g L ⁻¹)
1A	1,17
1B	0,91
2A	1,45
2B	1,23
3A	0,99
3B	1,20
4A	1,31
4B	2,33
5A	1,39
5B	1,00
6A	1,35
6B	1,40

(continuação)

Ensaio	Concentração do Precipitado no Tempo de 12 Horas (g L⁻¹)
7A	2,90
7B	2,45
8A	0,94
8B	0,95
9A	0,74
9B	2,52
10A	2,00
10B	2,44
11A	1,25
11B	0,79

O ensaio 7, apenas meio Cooper, apresentou a maior concentração do precipitado, como era esperado. O pH ácido pode precipitar algumas proteínas do soro de leite, possivelmente isso interferiu nos resultados dos ensaios que utilizaram o soro de leite no meio de cultivo.

A condição 7, que continha apenas meio Cooper, apresentou a melhor redução da tensão superficial e o maior índice de emulsificação para o tempo de 12 horas, o que não foi observado para os ensaios com concentração maior que 50% do soro de leite (ensaios 2, 4 e 8). Para confirmar a influência negativa do soro de leite na produção do biossurfactante e como a temperatura não foi uma variável estatisticamente significativa, novos ensaios foram realizados em duplicata usando apenas meio Cooper, e meio Cooper e soro de leite (50% de cada), a 32°C e 150 rpm, durante 96 horas. Os valores obtidos para a tensão superficial são apresentados na Tabela 6, assim como os resultados para extração do biossurfactante usando apenas meio Cooper são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6. Tensões superficiais para meio Cooper e para meio Cooper e soro de leite 50%.

Meio	Tensões Superficiais (mN/m)					
	0h	12h	24h	48h	72h	96h
Cooper A	52,9	31,0	31,9	29,0	33,0	31,9
Cooper B	51,1	32,1	31,8	31,9	33,0	31,9
Soro 50%A	44,1	34,6	32,0	32,2	29,8	36,1
Soro 50%B	44,1	33,8	30,6	34,1	33,5	34,1

Tabela 7. Concentração do precipitado para o ensaio contendo apenas meio Cooper.

	Concentração do Precipitado (g L ⁻¹)					
	0h	12h	24h	48h	72h	96h
Cooper A	2,45	3,68	2,67	2,43	1,69	1,56
Cooper B	1,99	3,07	2,08	2,76	1,89	1,82

Os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7 confirmaram que o meio Cooper foi melhor para a produção do biossurfactante, já que apresentou um abaixamento da tensão superficial de, aproximadamente, 22 mN/m, considerando a tensão superficial do meio Cooper livre de células 53,5 mN/m, e um rendimento de 3,68 g L⁻¹ na extração. Os ensaios com 50% do soro tiveram redução da tensão superficial de cerca de 12 mN/m, considerando a tensão superficial do meio com soro de leite e meio Cooper (50% de cada) livre de células 45,5 mN/m, o que comprova, novamente, a influência desfavorável da presença do soro no meio de cultivo.

A concentração de lactose e de ácidos graxos no soro de leite utilizado neste trabalho foi de 4,60% (m/v) e 0,98% (m/v), respectivamente. O trabalho de Cagri-Mehmetoglu, *et al*, (2012) mostrou que a surfactina pode ser obtida a partir de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando soro de leite em pó reidratado (10, 15 e 20% p/v), após 72 horas de fermentação a 30°C, com composição de 0% de ácidos graxos e uma concentração de lactose duas vezes maior que a utilizada nas condições deste trabalho. Dessa forma, a composição do soro de leite empregado nos ensaios realizados não favoreceu a produção do biossurfactante.

Neste trabalho, o biossurfactante produzido não foi identificado, portanto, não foi chamado de surfactina.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos nos ensaios realizados foi observado que o meio de cultivo contendo soro de leite não favoreceu a formação do biossurfactante, o que pode ser explicado pela composição do soro de leite, já que o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 cresceu em meio de cultivo contendo apenas soro de leite (dados não apresentados). Um possível ajuste na composição do soro de leite pode favorecer a produção do biossurfactante e outra possibilidade seria o emprego de processos de hidrólise ácida para permitir a quebra da molécula de lactose em açúcares menores, como glicose e galactose, que seriam mais facilmente metabolizados pelo microrganismo. Os ensaios usando apenas meio Cooper mostraram que é possível a produção do biossurfactante, já que apresentaram uma redução significativa da tensão superficial, um melhor índice de emulsificação e um bom rendimento na extração do biossurfactante.

A busca de melhores condições para a produção de biossurfactante é essencial para diminuir os custos na obtenção, e assim, permitir seu aproveitamento, já que os biossurfactantes apresentam uma diversidade de aplicações e acarretam em menores consequências ambientais em comparação com a utilização de surfactantes de origem petroquímica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-LEHIA, I. H.. A simple and rapid colorimetric method for lactose determination in milk. *Food Chemistry*, v. 24, p. 233- 240, 1987.

ACIOLY, L. M. L. *Produção de biossurfactante por Bacillus subtilis UCP 0999 em substratos não convencionais e de baixo custo*. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais), Universidade Católica de Pernambuco. Recife, 2009.

AL-ARAJI, L. et al. Microbial Surfactant. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 99-105, 2007.

ALHANATI, L. S. Tensão Superficial. Disponível em: <http://alfaconnection.pro.br/pag_avsf/fqm0101.htm>. Acesso em: 04 de Novembro de 2015.

BARBOSA, A. S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: Estudo cinético da produção de Etanol. *Revista Verde*, v. 5, p. 7-25, 2010.

BARROS, F. F. C. et al. (2005). Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BUGAY, C. *Biossurfactante produzidos por Bacillus sp: Estudos de produção e Caracterização*. 2009. 82 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S.; VENTER, M. V. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 3643-3649, 2012.

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

CONTIERO, J. et al. Da biotecnologia à biorrefinaria. In: LEMOS, E. G. de M.; STRADIOTTO, N. R. (Orgs). *Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação*. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. p. 753-831.

COOPER, D. G. et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Journal Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

EUROASIAN CHEMICALS PVT. LTD. Anti-fungal. Disponível em: <<http://www.euroasiarnd.com/productdetail-Iturin-A-ANTI-FUNGAL-45378-25.html>>. Acesso em: 16 de Novembro de 2015.

FELIX, A. K. N. *Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por Bacillus subtilis LAM1005 a partir do suco de caju*. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

FERNANDES, P. A. V. *Produção, extração e caracterização de surfactante por Bacillus subtilis R14*. 2006. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

GEA NIRO ANALYTICAL METHODS. Total Fat (Röse-Gottlieb Method). Disponível em: <[http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/pickfile/DA8BC7580EF81F9AC12575BC003F489F/\\$FILE/gea-niro-total-fat-rose-gottlieb-method-a9a.pdf](http://www.niro.com/niro/cmsresources.nsf/pickfile/DA8BC7580EF81F9AC12575BC003F489F/$FILE/gea-niro-total-fat-rose-gottlieb-method-a9a.pdf)>. Acesso em: 09 de Fevereiro de 2015.

GOMES, M. J. P. Gênero *Bacillus* spp. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>>. Acesso em: 28 de Novembro de 2015.

LIMA JUNIOR, G. A. de. *Obtenção de surfactina pelo micro-organismo Bacillus subtilis ATCC 6633*. 2012. 48 p. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

MEDEIROS, F. H. V. et al. Indução de resistência em plantas: Estudos de casos e modos de ação. In: Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas, 5., 2011. Jaguariúna, 2011.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. (2000). Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C₇L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, p. 82-85, 2001.

PACCEZ, J. D. *Aplicação de linhagens geneticamente modificadas de Bacillus subtilis no desenvolvimento de vacinas de mucosas contra patógenos entéricos*. 2007. 91 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

PEREIRA, J. F. B. et al. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, v. 111, p. 259-268, 2013.