

74278 - UTILIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *BACILLUS SUBTILIS*

*Emanuele Cardoso Dias¹, Adrielly Silva Albuquerque de Andrade¹, Arauana Lima e
Silva², César Henrique Araújo Dias³, Adna Cristina Barbosa de Sousa⁴, Andréa Farias
de Almeida⁵*

¹Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900.

²Graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900.

³Graduando em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900.

⁴Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900.

⁵Doutora e Professora de Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB, Cidade Universitária, s/n, Castelo Branco, João Pessoa – PB, 58051-900, e-mail: andreaafalm@cbiotec.ufpb.br

RESUMO: Biossurfactantes são moléculas anfipáticas sintetizadas por micro-organismos que agem nas interfaces água/óleo ou óleo/água reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre elas e assim tornando alguns compostos mais miscíveis. Em comparação aos surfactantes sintéticos que estão no mercado, apresentam diversas vantagens, como a biodegradabilidade e baixa toxicidade conferindo-lhes relevada importância. A utilização de substratos não convencionais, sobretudo renováveis, é uma estratégia de produção de biossurfactantes devido ao baixo custo oferecido, constituindo um dos fatores mais importantes para a viabilização econômica em escala industrial. Neste trabalho, a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando o extrato aquoso da algaroba como substrato alternativo foi estudada, utilizando-se um planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central, para avaliar a influência da concentração desse substrato e extrato de levedura nessa produção. Diante dos resultados, o aumento da concentração do extrato aquoso de algaroba com suplementação de extrato de levedura favoreceu o crescimento do micro-organismo e a produção de biossurfactantes, comprovados pelo planejamento fatorial realizado. O

indicativo de produção de biossurfactante, índice de emulsificação, foi maior no cultivo utilizando a suplementação a 0,5 e 1,0 % de extrato de levedura. Os resultados indicam a viabilidade de produção de biossurfactantes a partir do extrato aquoso da algaroba, substrato de baixo custo e abundante na região Nordeste.

Palavras-chave: Biossurfactantes; *Bacillus subtilis*; Algaroba.

USE OF ALGAROBA AQUEOUS EXTRACT IN *BACILLUS SUBTILIS* PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS

ABSTRACT: Biosurfactants are amphipathic molecules synthesized by microorganisms that act at the water/oil or oil/water interfaces, reducing the surface and interfacial tensions between them and thus making some compounds more miscible. In comparison to the synthetic surfactants that are on the market, they present several advantages, such as biodegradability and low toxicity giving them important importance. The use of non- conventional substrates, mainly renewable, is a strategy of biosurfactants production due to the low cost offered, constituting one of the most important factors for the economic feasibility on an industrial scale. In this work, the production of biosurfactants by *Bacillus subtilis* using the aqueous extract of the algaroba as alternative substrate was studied, using a 2² factorial design with triplicate in the central point, to evaluate the influence of the concentration of this substrate and yeast extract in this production. In view of the results, the increase of the concentration of the algaroba aqueous extract with yeast extract supplementation favored the growth of the microorganism and the production of biosurfactants, as evidenced by the factorial planning. The indicative of biosurfactant production, emulsification index, was higher in the culture using the supplementation at 0.5 and 1.0 % of yeast extract. The results indicate the feasibility of producing biosurfactants from the aqueous extract of the algaroba, a low cost and abundant substrate in the Northeast region.

Keywords: Biosurfactants; *Bacillus subtilis*; Algaroba.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas sintetizadas por micro-organismos que agem nas interfaces água/óleo ou óleo/água reduzindo as tensões superficiais e

interfaciais entre elas e assim tornando alguns compostos mais miscíveis (1). Devido essa propriedade, várias são as aplicações industriais que envolvem o uso de biossurfactantes, como indústria de petróleo, farmacêutica, 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, entre outras.

Em comparação aos surfactantes sintéticos que estão no mercado, apresentam diversas vantagens, como a biodegradabilidade e baixa toxicidade conferindo-lhes relevada importância, pois tem recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Os biossurfactantes apresentam-se como potenciais substitutos dos surfactantes químicos derivados da indústria petrolífera. Embora tenha propriedades que demonstram vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, a sua produção ainda é um processo muito caro.

Os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de substratos que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos, suprimindo a necessidade de fonte de carbono para sua produção (11). A utilização de substratos não convencionais, sobretudo renováveis, é uma estratégia de produção interessante devido ao baixo custo oferecido, constituindo um dos fatores mais importantes para a viabilização econômica em escala industrial.

Nos últimos anos, diversas pesquisas foram realizadas com base na utilização de substratos alternativos para produção de biossurfactantes de origem microbiana: manipueira, melão, glicerol, vinhaça, que são normalmente considerados subprodutos em muitos processos industriais.

A algaroba é uma espécie xerófila originária do deserto de Piúra no Peru e foi introduzida no nordeste brasileiro devido sua rusticidade e por frutificar na época mais seca do ano, sendo a única fonte alimentar economicamente viável que permite a sobrevivência da criação de bovinos e caprinos no semiárido brasileiro (18). Seu fruto é uma vagem rica em proteína, gordura, vitaminas, sais minerais e, principalmente, açúcar e amido (3), que normalmente no período de seca é utilizada como ração animal. Devido tais características, a vagem da algaroba pode ser considerada um potencial substrato para o desenvolvimento microbiano e produção de biossurfactantes.

Neste sentido, o trabalho teve como objetivo o estudo da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* a partir do extrato aquoso da algaroba como substrato alternativo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato

As vagens de algaroba foram retiradas de algarobeira oriunda da cidade de Japi, localizada na região do semiárido do Rio Grande do Norte. A obtenção do extrato aquoso da algaroba foi realizada de acordo com a metodologia de (15).

Caracterização físico-química do substrato

A caracterização físico-química do extrato aquoso da algaroba foi realizada quanto ao teor dos açúcares redutores totais (ART), teor de sólidos solúveis (°brix) e pH.

Teor de açúcares redutores totais (ART) Para determinação dos açúcares redutores totais utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical (8). Essa metodologia baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico (9).
Teor de sólidos solúveis (°Brix).

Para determinação do teor de açúcares presente no extrato foi realizada leitura em refratômetro (NOVA - ABBE REFRACTOMETER) das amostras (6).

pH

O pH do extrato aquoso da algaroba foi determinado com auxílio de um potenciômetro digital (AKSO – AK 90) previamente calibrado com soluções padrões (4,0 – 7,0).

Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi *Bacillus subtilis*, linhagem UFPEDA 86, cedido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A cultura do *B. subtilis* foi mantida em meio sólido ágar Lúria-Bertani (LB) (Tabela 1) em tubos inclinados. Os repiques das células foram realizados periodicamente e incubados

a 37 °C, durante 24 horas para o crescimento, e em seguida, armazenados a 4 °C para sua conservação.

Tabela 1. Composição do meio Lúria-Bertani.

Composição	g/L
Triptona	10
Extrato de levedura	5
Ágar	5

Fonte: Cold Spring Harbor Protocols CSH protocols, 2017.

Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado através da transferência, com alça de platina, das colônias isoladas do micro-organismo do meio de manutenção para o Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL do meio de cultivo, e incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm em incubadora rotativa refrigerada (modelo solab 223). O crescimento do micro-organismo foi acompanhado pela determinação da densidade óptica a 600 nm (D.O._{600nm}), ao alcançar uma absorvância entre 0,6 e 0,8. Um volume de 10 % (v/v) dessa cultura foi inoculado nos cultivos para a produção de biossurfactantes.

Produção de biossurfactante

Os cultivos para produção de biossurfactante a partir do extrato aquoso da algaroba como substrato foram realizados em incubadora rotativa refrigerada. Frascos erlenmeyers de 250 mL, com volume de 100 mL de meio de cultivo, agitados a 200 rpm e temperatura controlada de 37 °C foram acompanhados, em tempos regulares, durante 96 horas de processo.

Um planejamento experimental fatorial 2², com triplicata do ponto central, foi realizado para verificar a influência das concentrações do extrato aquoso da algaroba (substrato) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio) sobre a produção de biossurfactante. Para tanto, o índice de emulsificação como indicativo da presença de biossurfactante foi analisado como variável resposta. As Tabelas 2 e 3 apresentam os fatores com os níveis estudados e a matriz do planejamento, respectivamente, utilizados nos experimentos.

Tabela 2: Fatores com os níveis estudados.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
1 – Algaroba (g/L)	10	15	20
2 - Nitrogênio (%p/v)	0,0	0,5	1,0

Fonte: Autor.

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central.

Ensaio	[Extrato aquoso da algaroba] g/L	[Extrato de levedura] % (p/v)
1	(-1) 10	(-1) 0,0
2	(+1) 20	(-1) 0,0
3	(-1) 10	(+1) 1,0
4	(+1) 20	(+1) 1,0
5	(0) 15	(0) 0,5
6	(0) 15	(0) 0,5
7	(0) 15	(0) 0,5

Fonte: Autor.

Análise das variáveis do processo

As amostras foram retiradas a cada 4 horas, durante as primeiras 12 horas de cultivo, e a cada 12 horas até às 60 horas de processo para serem analisadas quanto à concentração de biomassa, consumo do substrato e produção do biossurfactante. Posteriormente, foi determinado os parâmetros cinéticos: velocidade específica máxima de crescimento, tempo de geração, fatores de conversão e produtividade em células.

Crescimento celular

O crescimento microbiano foi acompanhado pelo peso seco. O peso seco consistia em adicionar 2 mL de caldo fermentado a um microtubo de massa conhecida, centrifugar (10000 rpm por 10 minutos) e ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* sedimentado foi pesado e levado a estufa (OLIDEF-CZ) a 85 °C por 24 horas. Em seguida, o *pellet* livre de umidade foi pesado. O procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco foi determinado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Peso seco (g/mL)} = \frac{(\text{massa do microtubo} + \text{pellet livre de umidade}) - \text{massa do microtubo}}{\text{volume da amostra}}$$

Eq. (1)

Quantificação do substrato

A concentração de substrato foi determinada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) (9). Para determinar a concentração dos açúcares redutores totais foi preciso hidrolisar a amostra, uma vez que o extrato aquoso da algaroba é rico em sacarose. O procedimento ocorreu com a introdução de 1 mL de cada amostra, 0,5 mL de ácido clorídrico e 6 mL de água em um balão volumétrico de 50 mL. O balão foi levado ao banho termostatizado (Banho maria SL 150 - SOLAB) por 10 minutos a 70 °C, em seguida foram adicionados 2 mL de NaOH (4N) e água destilada até completar o volume do balão. Após a hidrólise das amostras, colocou-se em tubos de ensaio 0,5 mL da amostra hidrolisada e 0,5 mL do reagente DNS. A amostra foi levada ao banho termostatizado a 100 °C por 10 minutos. Após aquecimento, os tubos foram incubados em banho de gelo por 5 minutos. Por último, adicionou-se 4 mL de água destilada a amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. O branco é composto de 0,5 mL de água destilada ao invés da amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Quantificação do biossurfactantes

A quantificação do biossurfactante pode ser realizada de maneira indireta através do índice de emulsificação (3). A análise consistiu em misturar 4 mL do sobrenadante do caldo fermentado de cada amostra a 6 mL de substâncias hidrofóbicas (óleo vegetal, óleo de motor e querosene) separadamente em tubos. Posteriormente foram agitados vigorosamente em vórtex (modelo KMC- Vórtex Mixer) por 1min e deixados a 30 °C por 24 horas.

O índice de emulsificação foi determinado através da Equação 2.

$$\text{Índice de emulsificação (\%)} = \frac{\text{altura da emulsão (cm)}}{\text{altura total da coluna (cm)}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Análise dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos analisados foram a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x \text{ máx}}$), produtividade em células (P_x) e o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x\text{ máx}}$) foi estimada pelo método de detecção da fase de crescimento exponencial (15). A produtividade em células e o fator de conversão de substrato em células foram determinados pelas Equações 3 e 4, respectivamente.

$$P_x = \frac{X_{máx} - X_0}{t_f} \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que:

P_x - produtividade volumétrica de biomassa [$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$]

$X_{máx}$ - concentração máxima de células [g.L^{-1}]

X_0 - concentração inicial de células [g.L^{-1}]

t_f - tempo de fermentação [h]

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que:

$Y_{x/s}$ - fator de conversão

X - concentração final de células

X_0 - concentração inicial de células

S_0 - concentração inicial de substrato

S - concentração final de substrato

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química do substrato

A caracterização físico-química do extrato aquoso da algaroba foi realizada quanto ao teor de açúcares redutores totais (ART), teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) e pH. Os resultados desses parâmetros estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização do extrato aquoso da algaroba.

Extrato (%)	ART ([gli]g/L)	Teor de sólidos	
		solúveis (°Brix)	pH
<i>Extrato 1</i>	100,43	23,2	5,29
<i>Extrato 2</i>	100,21	22,8	5,6
<i>Extrato 3</i>	99,08	22,1	5,44

Fonte: Autor.

Os teores de açúcares redutores totais dos extratos variaram de 99,08 g/L a 100,43 g/L. Os teores de açúcares redutores totais relatados na literatura se diferenciam de acordo com as condições de cultivo da planta. Analisando a composição de açúcares redutores das vagens da algaroba encontraram 3,4 g/100g (32,8 g/L) e 4,03 g/100g (43,5 g/L) respectivamente (2, 12). Para a farinha da algaroba, Silva e colaboradores (17) obtiveram uma concentração de açúcares redutores de 4,6 g g/100g equivalentes a 49,7 g/L. Os resultados da literatura em g/100g foram convertidos em g/L para simplificar as analogias dos cálculos. Os valores obtidos neste trabalho mostraram que o extrato aquoso da algaroba tem açúcares fermentescíveis suficientes para o desenvolvimento de micro-organismos para obtenção de biossurfactantes.

Os valores de pH nas três amostras de extratos aquosos da algaroba mostraram-se uniformes, uma vez que o extrato foi obtido de um mesmo conjunto de vagens. Estes valores coincidem com os valores encontrados na literatura, quando se trata do extrato bruto da algaroba na produção de enzimas, entre outros bioprocessos, como por exemplo, a utilização do extrato de algaroba como fonte alternativa para a produção de celulose bacteriana, obteve-se valores próximos de pH variando entre 4,0 e 8,0. Ao longo da fermentação, prevaleceu o fermentado com caráter ácido (15).

Crescimento celular

Os processos fermentativos utilizando extrato aquoso da algaroba como substrato foram realizados com a finalidade de conhecer o comportamento do *B. subtilis* em cultivo

submerso, uma vez que não há na literatura relatos sobre a utilização desse substrato para produção de biossurfactantes.

A Figura 1 ilustra o perfil de crescimento celular observado no cultivo com o extrato aquoso da algaroba diluído de acordo com o planejamento experimental fatorial proposto.

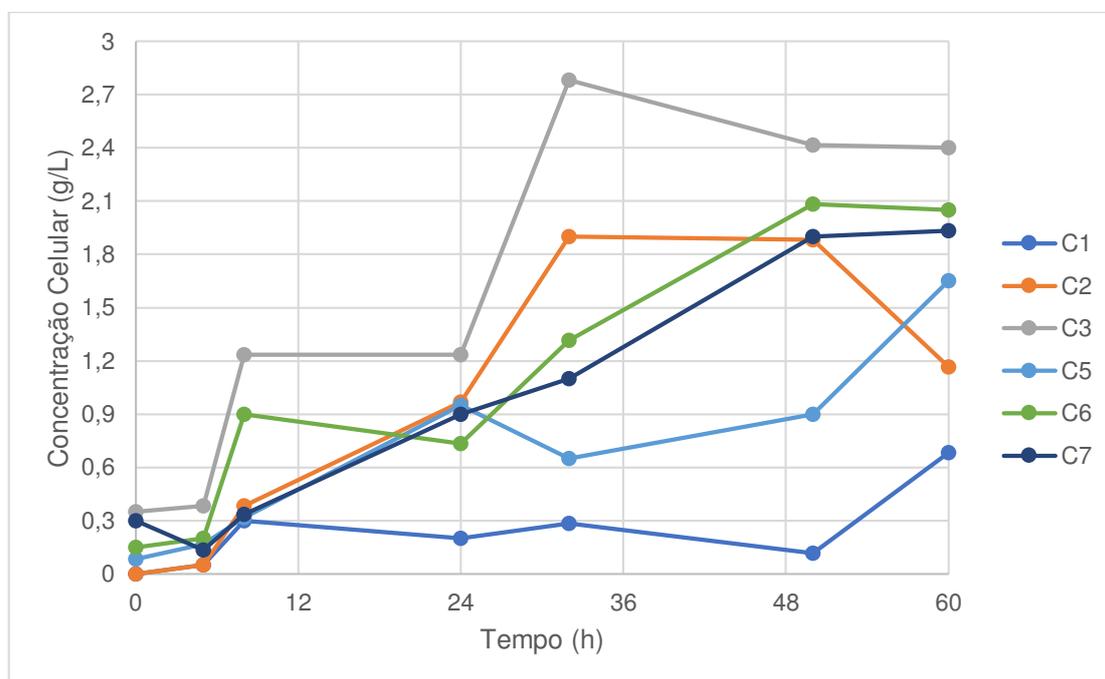


Figura 1. Perfil da concentração celular durante o tempo de cultivo utilizando extrato aquoso de algaroba, de acordo com o planejamento experimental fatorial 2^2 , com 3 repetições no ponto central, exceto o experimento 4. Fonte: Autor.

De acordo com a Figura 1, observou-se uma fase de adaptação do micro-organismo ao meio, nas primeiras 5 horas de processo. Após esse período, em todos os experimentos, ocorreu o início da fase exponencial, fase esta que a reprodução celular se encontra extremamente ativa, proporcionando a máxima velocidade específica de crescimento e intensa atividade metabólica.

Observou-se, ainda na Figura 1, a máxima produção de células nos experimentos realizados nas condições estabelecidas pelo planejamento. No experimento 1 (10 g/L de substrato e sem adição de extrato de levedura), a concentração máxima de células foi 0,683 g/L. Portanto, essa concentração de substrato sem suplementação com fonte de nitrogênio não favoreceu o crescimento celular. Já no experimento 2 (20 g/L de substrato e sem adição de extrato de levedura), a concentração máxima foi de 1,9 g/L, demonstrando que o aumento da concentração da fonte de carbono ampliou em 2,78

vezes a concentração celular do sistema. Ainda analisando o crescimento celular, o experimento 3 (10 g/L de substrato e 1,0 % (p/v) de extrato de levedura), obteve-se uma concentração máxima de células de 2,78 g/L, triplicando a concentração celular observada no experimento 1, quando se utilizou a mesma concentração de substrato. Portanto, nesse experimento a suplementação da fonte de nitrogênio favoreceu o aumento da concentração de biomassa.

Analisando os experimentos 5, 6 e 7, que representam os pontos centrais, ou seja, concentração de substrato a 15 g/L e 0,5% (p/v) de extrato de levedura, os valores da concentração celular foram próximos aos observados no experimento 2. Os resultados encontrados, possuem valores mais significativos quando comparados a alguns trabalhos na literatura. O *B. subtilis* foi cultivado no meio contendo melão de cana como substrato e os valores da concentração celular máxima foi de 0,9 a 1,1 g/L (13).

A Figura 2 ilustra o perfil da concentração celular do experimento 4 do planejamento. Este cultivo, apresentou em 32 horas de cultivo, a concentração máxima de células de 10,66 g/L, demonstrando ser a condição de processo que mais a linhagem se adaptou para a produção do biossurfactantes.

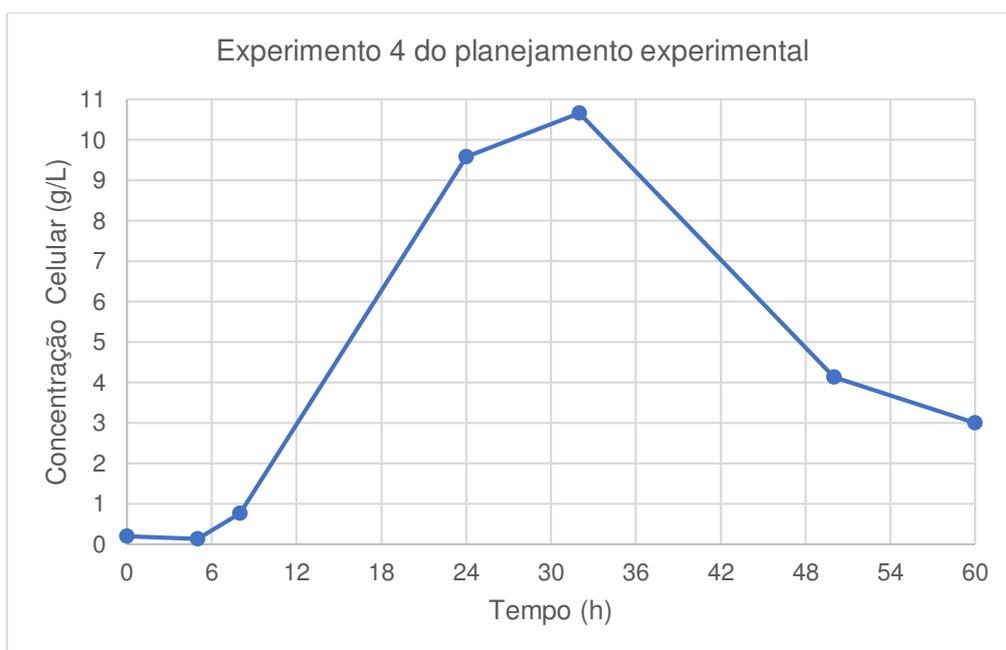


Figura 2. Perfil da concentração celular durante o cultivo utilizando extrato aquoso da algaroba na condição 4 (20 g/L de açúcares e 1,0% de extrato de levedura). Fonte: Autor.

Concentração de substrato

A Figura 3 mostra o consumo do substrato oriundo do metabolismo do *B. subtilis*. Das condições principais, de 1 a 4, observa-se que na condição 2 obteve-se uma redução de aproximadamente 50 % do substrato, juntamente com a condição 4, onde houve uma queda de 14,8 g/L para 4,5 g/L de substrato em 60 horas de cultivo. Valores próximos foram encontrados, onde a produção de biossurfactantes foi utilizando um meio mais viscoso e com alto teor de açúcares. Já em meio utilizando pedúnculo de caju com e sem adição de fonte de nitrogênio para produção de biossurfactantes utilizando *B. subtilis* e *P. aeruginosa* como agentes biotransformadores, obteve um consumo de substrato de quase 100 % (13).

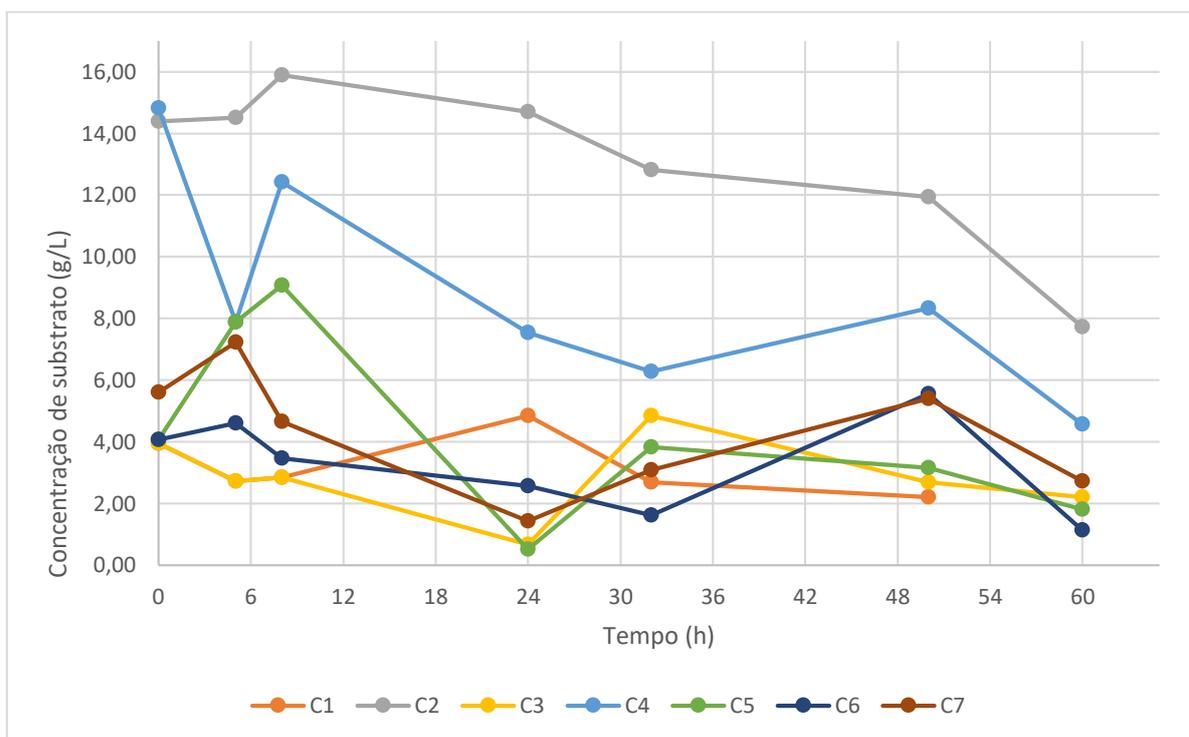


Figura 3. Consumo de substrato do planejamento da fermentação utilizando o extrato aquoso da algaroba como substrato na produção de biossurfactante. Fonte: Autor.

Análise dos parâmetros cinéticos

Tabela 5. Os parâmetros cinéticos avaliados nas condições do planejamento.

Ensaio	P_x ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	$Y_{x/s}$ (g/g)	μ_{max} (h^{-1})	t_g (h)
1	0,011389	0,390579	0,0658	10,53415
2	0,031667	0,175161	0,0654	10,59858
3	0,040556	1,171737	0,0698	9,930475
4	0,174444	0,273126	0,1166	5,944658
5	0,026111	0,689757	0,0969	7,153222
6	0,032222	0,644813	0,0377	18,38587
7	0,027222	0,566106	0,0406	17,07259

Estudos relacionados à produção de biossurfactantes têm diversas variações entre os sistemas que podem ser analisadas (6). Existem casos que a produção é significativa em condições limitantes de crescimento, pela concentração de nitrogênio e de cátions multivalentes (8). Os biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* são sintetizados na fase exponencial de crescimento, enquanto outros autores defendem a ideia de que são sintetizados na fase estacionária (2). O fato do produto formado estar ou não associado ao crescimento celular é dependente de diversos fatores, dentre eles, podemos destacar a espécie do micro-organismo, assim como também o meio de cultivo utilizado (5).

Índice de emulsificação

Os resultados dos índices de emulsificação estão demonstrados na Figura 4 e representam o perfil obtido em cada condição oferecida. Uma ocorrência constante na análise dos índices de emulsificação foi a baixa porcentagem de emulsificação para querosene. Para o óleo de motor foram observados índices bem expressivos e indicam de maneira indireta a produção do biossurfactante em todos os cultivos.

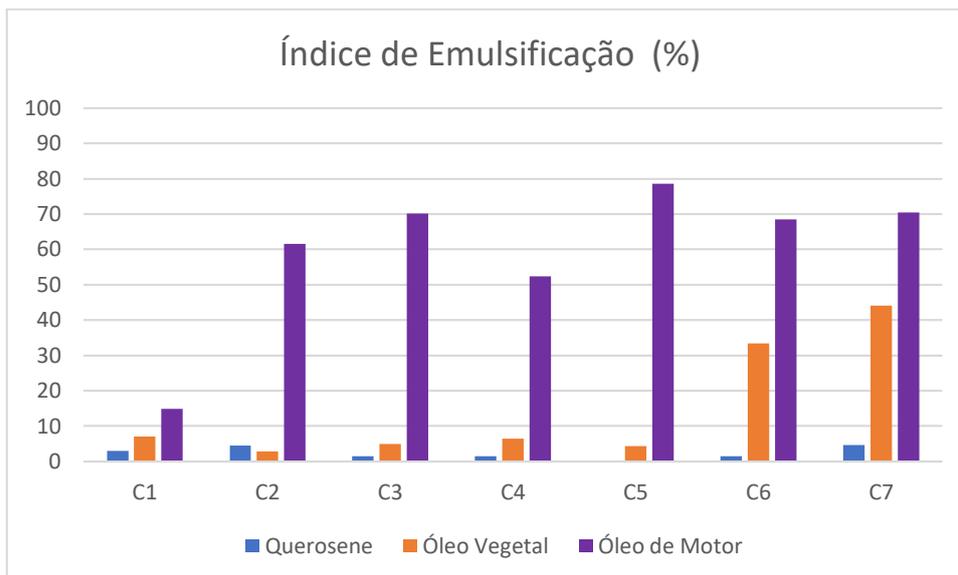


Figura 4. Índice de emulsificação nas condições do planejamento fatorial. Fonte: Autor.

O indicativo de produção de biossurfactante foi maior no cultivo utilizando a suplementação a 0,5 % de extrato de levedura, nas condições intermediárias (pontos centrais) e a 1 % nas condições 3 e 4 do cultivo. De acordo com alguns pesquisadores, para que a emulsão seja considerada eficaz, o índice de emulsificação deve ser superior a 40 % (19). Logo, diante dos cultivos, permitiu-se inferir a presença de biossurfactante obtido nos experimentos analisados.

Análise do planejamento fatorial 2²

Gráfico de Pareto

O gráfico de Pareto destaca os fatores que contribuem com significância estatística o processo fermentativo. O Gráfico mostra os fatores que influenciaram no índice de emulsificação, ao nível de confiança de 90 % (Figura 5). Foi observado que a variável que interfere significativamente no percentual de emulsificação é a concentração de nitrogênio adicionado ao meio de cultivo. Ou seja, nos cultivos suplementados, obteve-se níveis mais elevados de emulsificação.

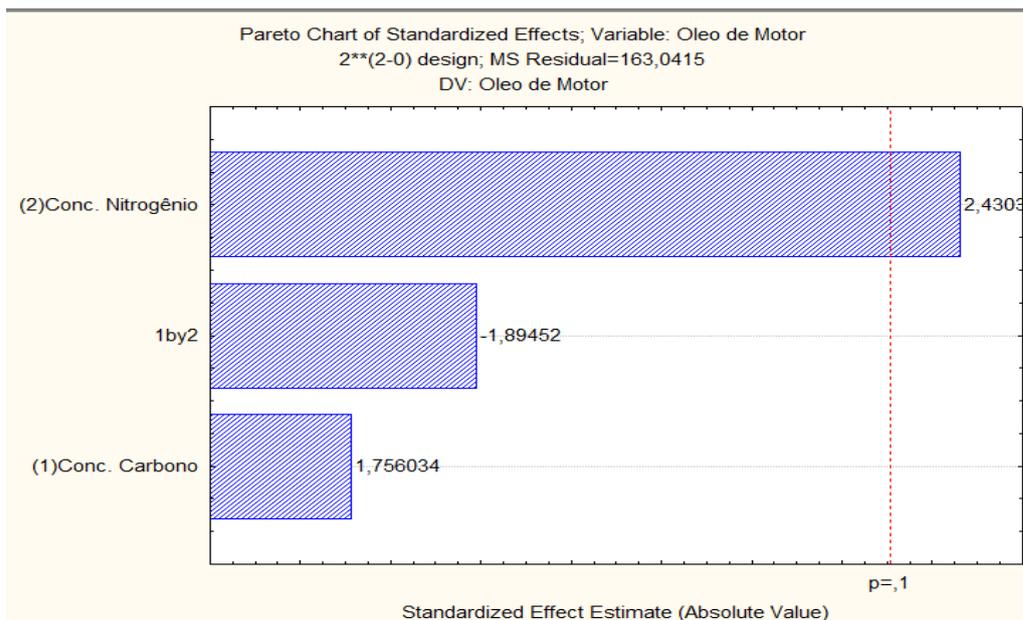


Figura 5. Gráfico de Pareto para análise dos fatores dos ensaios em resposta ao índice de emulsificação. Fonte: Autor.

Superfície de Resposta

A Figura 6 mostra a análise de superfície resposta configurada pelo planejamento experimental fatorial proposto. A superfície de resposta pode ser explorada para determinar condições ótimas de processo ou a sensibilidade da variável resposta a mudanças dos níveis dos fatores de interesse. Neste caso, pode-se observar que o alto índice de emulsificação foi favorecido pelo o aumento da concentração de nitrogênio e também, da concentração de carbono, mostrando que a região em vermelho intenso é a região de otimização do índice de emulsificação e, conseguinte, produção do biossurfactante.

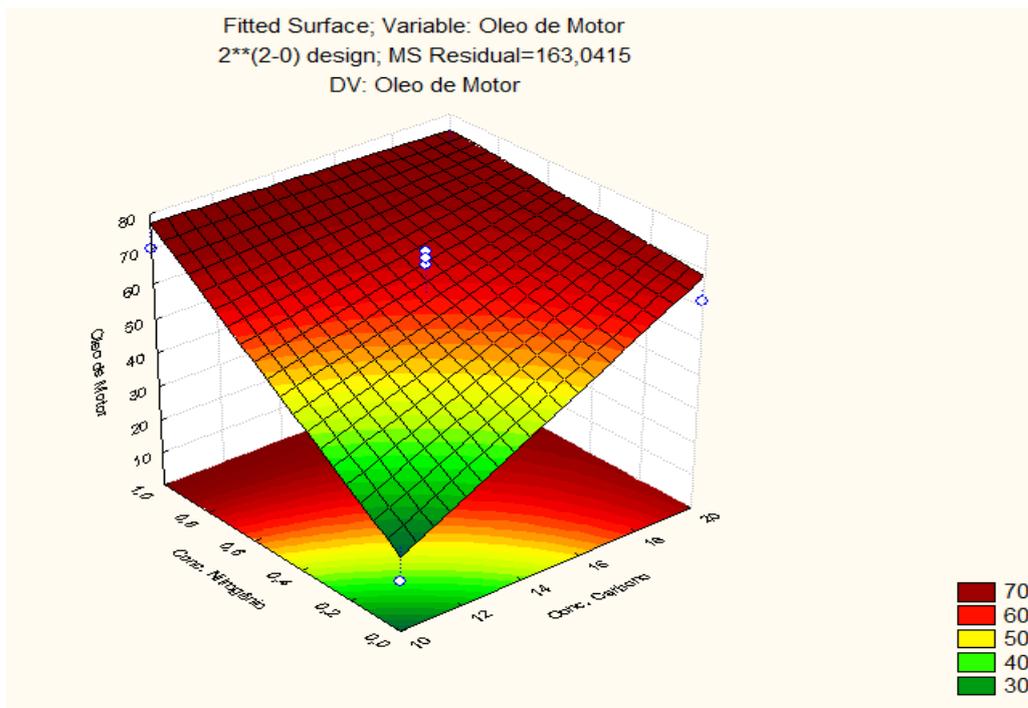


Figura 6. Superfície de resposta do planejamento experimental 2^2 com triplicata no ponto Central. Fonte: Autor.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a capacidade do micro-organismo em se desenvolver utilizando o extrato aquoso da algaroba, e em produzir biosurfactante com capacidade tensoativa e emulsificante. Esses resultados motivam estudos futuros de otimização do processo, visando possíveis aplicações do biosurfactante na remoção de poluentes hidrofóbicos da água e do solo, assim como também em testes farmacológicos.

REFERÊNCIAS

1. Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010; 87: 427-444.
2. Besson F, Michel G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: Evidence for aminoacid activating enzymes. Biotechnology Letters. 1992; 14: 1013-1018.
3. Borges IF. Obtenção e caracterização do melado de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua utilização em uma formulação alimentícia. [Tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba – UFPB; 2004.

4. Cooper DG, Goldenberg BG. Surface active agents from two *Bacillus species*. Appl. Environ. Microbiol. 1987; 53: 224–229.
5. Debon J. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbia. [Tese]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2015.
6. Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbial Molecular Reviews. 1997; 61: 47-64.
7. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo.
8. Kosaric N, Cairns WL, Gray NCC. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. In: Kosaric N, Cairns WL, Gray NCC, editores. Biosurfactants and biotechnology. Surfactant Science Series. Dekker, New York; 1987, p. 247-331.
9. Maldonade IR, Carvalho PGB, Ferreira N.A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. EMBRAPA. Brasília, 2013.
10. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 1959; 31: 426-428.
11. Nascimento ES. Extrato de algaroba como fonte alternativa para produção de celulose bacteriana. [Tese]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará – UFC; 2014.
12. Nitschke M, Ferraz C, Pastore GM. Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes. Brazilian Journal of Microbiology. 2004; 35: 81-85.
13. Oliveira NF. Avaliação Físico-química e funcional da algaroba *prosopis juliflora* proveniente da mesorregião agreste do Rio Grande do Norte. [Tese], Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN; 2011.
14. Rocha MVP, Gomes RV, Melo VMM, Gonçalves LRB. Avaliação de diferentes fontes de carbono para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI007. Anais do VI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM). 2007; 1: 1-12.
15. Rocha PM. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato. [Tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN; 2017.
16. Schmidel W, Facciotti MCR. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidel W, editor. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Biotecnologia Industrial, São Paulo: Edgar Blucher; 2001, p. 179-192.
17. Silva CG. Otimização do Processo de Produção da Aguardente de Algaroba e Aproveitamento dos Resíduos Sólidos em Produtos Alimentares. [Tese]. Campina Grande: Universidade Federal de Campina Grande; 2009.
18. Silva CGM, Melo Filho AB, Pires EF, Stamford TLM. Caracterização Físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW.) DC). Ciênc. Tecnol. Aliment. 2007; 27: 733-736.

19. Silva JHV, Oliveira JNC, Silva EL. Uso da farinha integral de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (sw) D.C.) na alimentação de codornas japonesas. Revista Brasileira de Zootecnia. 2002; 31: 1789-1795.

20. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, Inerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. Journal of Microbiological Methods. 2004; 56: 339-347.