



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA EDUARDA DE SOUZA MAIA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS E ANÁLISE DA TOXICIDADE EM PEIXE ZEBRA
(*Danio rerio*)**

JOÃO PESSOA - PB

2020

MARIA EDUARDA DE SOUZA MAIA

**PRODUÇÃO DE BIODERIVADOS A PARTIR DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS E ANÁLISE DA TOXICIDADE EM PEIXE ZEBRA
(*Danio rerio*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Biotecnologia do Centro
de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba
– UFPB, em cumprimento às exigências para
obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia
desta instituição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA - PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M217p Maia, Maria Eduarda de Souza.

Produção de biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais e análise da toxicidade em peixe zebra (danio rerio) / Maria Eduarda de Souza Maia. - João Pessoa, 2020.

60 f. : il.

Orientação: Andréa Farias Almeida.

TCC (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Biotecnologia. 2. Produção de biossurfactantes. 3. Resíduos agroindustriais. 4. Peixe zebra. I. Almeida, Andréa Farias. II. Título.

UFPB/CCEN

CDU 60(043.2)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e cinco dias do mês de novembro de 2020, às 14:00h, em sessão pública realizada de forma remota, na Plataforma Google Meet, em atendimento à Portaria N°232/GR/REITORIA/UFPB, de 16 de outubro de 2020 e a Resolução Consepe N° 19/2020, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) Professor(a) Dr(a). Andréa Farias de Almeida (DB/CBIOTEC/UFPB) e composta pelo(a)s avaliadore(a)s: 1. Prof(a). Dr(a). Adna Cristina Barbosa de Sousa (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Prof(a). Dr(a). Ian Porto Gurgel do Amaral (DBCM/CBIOTEC/UFPB), o(a) discente Maria Eduarda de Souza Maia, matrícula 2016084767, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Produção de biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais e análise da toxicidade em peixe-zebra (*Danio rerio*)”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **aprovação** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a(ao) discente e demais presentes e eu, Andréa Farias de Almeida, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelo(a)s demais avaliadore(a)s e pelo(a) discente.

 _____ Presidente da Banca Examinadora	 _____ Avaliador(a) 1
 _____ Discente	 _____ Avaliador(a) 2

João Pessoa/PB, 25 de novembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me apoiarem em todas as minhas decisões, em especial ao meu pai Eduardo Jorge Xavier Maia, por ser a minha inspiração pessoal e profissional.

À Universidade Federal da Paraíba, por ter proporcionado a minha formação acadêmica.

Ao CBIOTEC e a todos os professores que me apoiaram durante todo o curso.

A professora Dra. Andrea Farias de Almeida, que além de ser uma ótima professora, amiga e orientadora, é um ser humano incrível. Vou levar nossas conversas e seus ensinamentos para o resto da minha vida.

Ao Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – LEBp/CBIOTEC/UFPB, por todo apoio e assistência durante todo esse ano.

Ao Laboratório de Avaliação de risco de Novas Tecnologias (LABRISCO) -DBM/UFPB, por todo suporte durante todo esse tempo.

Ao professor Dr. Davi Felipe Farias, por todo apoio, incentivo e inspiração durante todo o tempo que passei no laboratório.

Ao meu primo Rafael Xavier, por ter me ajudado muito durante os experimentos e na minha vida acadêmica.

Ao Laboratório de Genética Vegetal - CBIOTEC/UFPB, Laboratório de Biologia Celular e Molecular - CBIOTEC/UFPB e ao Laboratório de Bioprocessos – CT/UFPB, por disponibilizar os equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, Adna Cristina Barbosa de Sousa e Ian Porto Gurgel do Amaral por terem aceitado contribuir para o enriquecimento desse trabalho

Aos meus amigos, em especial Monalisa, Yasmim, Talita e Luana, por terem transformado o curso em 4 anos incríveis, levarei vocês ao meu lado pelo resto da minha vida.

À José Carlos da Cruz Barbosa, por todo companheirismo, incentivo e amor durante essa jornada.

À minha família, em especial meus tios Joseildo e Antônia, e minhas avós Suely e Maria José, por todo amor durante toda minha vida.

E a todos que me ajudaram de alguma maneira a chegar nesse momento

“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você se lembrar de acender a luz”

*Dumbledore (J.K Rowling)
(Harry Potter e o prisioneiro de Azkaban)*

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas de origem microbiana que agem em 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, apresentam diversas vantagens, como a biodegradabilidade e baixa toxicidade conferindo-lhes relevada importância. Entretanto, apesar dos benefícios, o processo de produção de biossurfactantes necessita ser barateado de modo a substituir os surfactantes sintéticos existentes no mercado. A utilização de substrato de menor custo é uma estratégia de tornar o processo mais competitivo em escala industrial. Resíduos agroindustriais, por serem compostos altamente nutritivos para o desenvolvimento microbiano, são exemplos de meios de cultivo de baixo custo para produção de biossurfactantes. Assim, o objetivo desse estudo foi a produção de biossurfactante utilizando meio contendo extrato aquoso da algaroba e a água do processamento úmido do milho e, ainda, analisar a toxicidade do biossurfactante produzido em peixe-zebra (*Danio rerio*). Os experimentos foram conduzidos em incubadora shaker (200 rpm a 37 °C, 96 horas), utilizando a linhagem de *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 em meio constituído por 10 % (v/v) do extrato aquoso do macerado de milho e 20 % (v/v) de extrato aquoso da algaroba. O crescimento microbiano foi acompanhado utilizando espectrofotometria (600 nm) e peso seco, o consumo de substrato foi determinado por quantificação de açúcares redutores, utilizando método DNS e a produção de biossurfactante foi determinada por índice de emulsificação e precipitação ácida do meio cultivado. A fase exponencial observada durante o processo foi de 0 a 48 horas, chegando à concentração máxima de biomassa de 4,64 g/L, do qual foi possível registrar 6,2 g/L de consumo de açúcares redutores. O alto índice de emulsificação foi constatado para óleo de motor (82 %) e óleo vegetal (64 %). Ao final do processo, a concentração de biossurfactantes foi de 30 mg/L. Os parâmetros cinéticos que foram avaliados, em relação à velocidade específica de crescimento ($\mu_{x_{max}} = 0,0170 \text{ h}^{-1}$) e fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S} = 0,0517 \text{ g}_x/\text{g}_s$), foram satisfatórios quando considera-se que o meio utilizado foi composto por resíduos agroindustriais, sem a utilização suplementação nutricional. Foi observado baixa toxicidade do biossurfactante no organismo modelo, obtendo um $CL_{50} > 100 \text{ mg/L}$, divergindo dos surfactantes sintéticos, demonstrando que o biossurfactante produzido não oferece risco ao ambiente. O meio utilizado, nas condições analisadas, mostrou-se favorável ao crescimento da linhagem *B. subtilis* UFPEDA 16 e produção de biossurfactantes de baixa toxicidade e de alta atividade emulsificante.

Palavras chave: *Bacillus subtilis*, extrato de algaroba, macerado de milho.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules of microbial origin that act at water / oil or oil / water interfaces, reducing surface and interfacial tensions between them and thus making some compounds more miscible. In comparison to synthetic surfactants, they present several advantages, such as biodegradability and low toxicity, giving them a relevant importance. However, despite the benefits, the production of biosurfactants needs to be made cheaper in order to replace the synthetic surfactants on the market. The use of lower cost substrate is a strategy to make the process more competitive on an industrial scale. Agro-industrial residues, as they are highly nutritious compounds for microbial development, are examples of low-cost culture media for the production of biosurfactants. Thus, the objective of this study was the production of biosurfactant using medium containing aqueous extract of mesquite and corn macerate, and to analyze the toxicity of the biosurfactant produced in zebrafish (*Danio rerio*). The experiments were carried out in a shaker incubator (200 rpm at 37°C, 96 hours), using the line of *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 in a medium consisting of 10% (v / v) of the aqueous extract of corn macerate and 20% (v / v) of aqueous extract of the mesquite. Microbial growth was monitored using spectrophotometry (600 nm) and dry weight, substrate consumption was determined by quantification of reducing sugars, using DNS method and the production of biosurfactant was determined by the emulsification index and acid precipitation of the cultivated medium. The exponential phase observed during the process was from 0 to 48 hours, reaching a maximum biomass concentration of 4.64 g / L, of which it was possible to record 6.2 g / L of reducing sugar consumption. The high emulsification index was found for motor oil (82%) and vegetable oil (64%). At the end of the process, the concentration of biosurfactants was 30 mg / L. The kinetic parameters were evaluated, in relation to the specific growth rate ($\mu_{x_{max}} = 0.0170 \text{ h}^{-1}$) and substrate conversion factor in cells ($Y_{x/s} = 0.0517 \text{ g}_x / \text{g}_s$) were satisfactory when considering that the medium used was composed of agro-industrial residues, without the use of nutritional supplementation. Low toxicity of the biosurfactant was observed in the model organism, obtaining an $LC_{50} > 100 \text{ mg / L}$, diverging from synthetic surfactants, demonstrating that the produced biosurfactant does not pose a risk to the environment. The medium used, under the conditions analyzed, was favorable to the growth of the *B. subtilis* UFPEDA 16 strain and the production of biosurfactants with low toxicity and high emulsifying activity.

Key words: *Bacillus subtilis*, mesquite extract, corn macerate

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação do biossurfactante	17
Figura 2: Morfologia do <i>Bacillus subtilis</i>	21
Figura 3: Lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i>	22
Figura 4: Resíduo do milho após a moagem.....	25
Figura 5: <i>Danio rerio</i>	28
Figura 6: Prensagem das vagens da algaroba	29
Figura 7: Meio para o cultivo contendo 10 % de resíduo úmido do milho e 20% de extrato aquoso da algaroba antes de ocorrer a inoculação.....	32
Figura 8: Amostras hidrolisadas com adição do DNS, a da esquerda é a amostra com 60 horas de cultivo, e a da direita consiste na amostra com 0 horas de cultivo.....	34
Figura 10: Amostras com adição do <i>coomassie brilliant blue</i> para análise de proteínas solúveis. Tubo da esquerda: amostra de 12 horas de cultivo, e a da direita: amostra de 60 horas de cultivo.	35
Figura 11: Processo de extração do biossurfactante	36
Figura 12: Índice de emulsificação.....	37
Figura 13: Dispositivo de acasalamento com coleta facilitada de embriões de peixe-zebra	38
Figura 14: Caracterização química do extrato aquoso da algaroba e do extrato aquoso do resíduo úmido do processamento do milho.....	39
Figura 15: Caracterização química do meio contendo o caldo da algaroba e do extrato aquoso do resíduo úmido da maceração do milho.....	39
Figura 16: Padronização do inóculo	40
Figura 17: Aumento da turbidez promovido pelo crescimento microbiano e formação de espuma decorrente da produção do biossurfactante. Erlenmeyer 1: meio sem a inoculação (controle); Erlenmeyer 2: meio após 60 horas de processo.....	41
Figura 18: Curva de crescimento microbiano e consumo do substrato.....	42
Figura 19: Curvas de crescimento microbiano e concentração de biossurfactante	43

Figura 20: Curva de concentração de proteínas totais e concentração de biossurfactante	43
Figura 21: Índices de emulsificação do óleo vegetal e de motor	44
Figura 22: Amostras para determinação do índice de emulsificação. Figura A: amostra com óleo vegetal durante a agitação; Figura B: amostra com óleo vegetal antes da agitação	45
Figura 23: Emulsificação no óleo vegetal e óleo de motor. Tubo A: emulsificação com óleo vegetal; Tubo B: emulsificação com óleo de motor	45
Figura 24: Extração do bioproduto. Figura A: sobrenadante após as 12 horas de precipitação ácida. Figura B: sobrenadante acidificado após a centrifugação. Figura C: bioproduto após a retirada do sobrenadante	46
Figura 25: Extração líquido-líquido	47
Figura 26: Parâmetros cinéticos determinados durante a fase exponencial de crescimento microbiano	47
Figura 27: Embriões de peixe-zebra expostos à surfactina	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais funções da surfactina	23
Tabela 2: Análise físico-química da algaroba (<i>Prosopis juliflora</i> (SW) D.C.)	24
Tabela 3: Análise físico-química do grão de milho	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1 Surfactantes sintéticos.....	16
3.2 Biossurfactantes.....	16
3.2.1 Classificação do biossurfactante.....	17
3.2.2 Propriedades do biossurfactante.....	18
3.2.2.1 Toxicidade do biossurfactante.....	19
3.3 Produção do biossurfactante.....	19
3.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	20
3.3.2 Surfactina.....	22
3.3.3 Algaroba.....	23
3.3.4 Resíduo úmido da maceração do milho	24
3.4 Parâmetros cinéticos.....	25
3.5 <i>Danio rerio</i>.....	27
3.5.1 <i>Danio rerio</i> como organismo modelo para toxicidade.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Substrato.....	29
4.1.1 Extrato da algaroba.....	29
4.1.2 Água de maceração do milho.....	30
4.1.3 Caracterização físico-química dos substratos.....	30
4.1.3.1 Teor de açúcares redutores totais (ART).....	30
4.1.3.2 Teor de açúcares redutores (AR).....	31
4.2 Microrganismo.....	31
4.3 Padronização do inóculo.....	31
4.4 Processo de produção de biossurfactantes.....	32
4.4.1 Cultivo.....	32
4.6 Análises dos processos fermentativos.....	33

4.6.1. Concentração de células.....	33
4.6.2 Quantificação do substrato.....	33
4.6.2.1 Quantificação de proteínas totais.....	34
4.6.3. Quantificação do bioproduto.....	35
4.6.4 Purificação do produto.....	35
4.8 Índice de emulsificação.....	36
4.9 Parâmetros cinéticos.....	37
4.10 Obtenção dos embriões e larvas de peixe-zebra.....	37
4.10.1 Exposição do biossurfactante aos embriões de peixe-zebra.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Caracterização do meio.....	39
5.2. Cultivo em incubadora rotativa orbital.....	40
5.3 Análises cinéticas do processo, consumo de substrato e formação de produto.....	41
5.4. Caracterização de biossurfactante.....	43
5.5 Extração e purificação do biossurfactante.....	46
5.6 Parâmetros cinéticos.....	47
5.7 Análise da toxicidade em embriões de peixe-zebra	48
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS.....	51
GLOSSÁRIO.....	55

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos amplamente utilizados em diversos processos industriais. Por sua natureza anfipática, ou seja, a molécula é composta por partes hidrofóbicas e hidrofílicas, possui a capacidade de se distribuir entre as interfaces de fases fluidas com diferentes polaridades, conseqüentemente reduzindo a tensão superficial (NITSCHKE; PASTORE 2002).

Porém, apesar dos benefícios, a grande maioria dos surfactantes é sintetizada utilizando derivados de petróleo, uma matéria prima não renovável. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores (NITSCHKE; PASTORE, 2002) estimula alternativas sustentáveis à substituição desses produtos por serem contaminantes ambientais, sendo prejudicial principalmente ao ambiente aquático (OLIVEIRA,2017). Com isso, a produção de moléculas com as mesmas funcionalidades sem o efeito danoso ao ambiente é essencial para a indústria. Assim, os biossurfactantes que são surfactantes naturais e biodegradáveis potencializam sua utilização no mercado

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por microrganismos e classificados de acordo com sua estrutura e origem microbiana. São compostos que têm a capacidade de diminuir a tensão superficial, conseqüentemente possuindo alta atividade emulsificante (NITSCHKE; PASTORE 2002), sendo também biodegradáveis, eficazes em pH e temperaturas extremas (ROCHA, 2009). Além de possuir uma toxicidade muito mais baixa que os seus similares sintéticos, sendo importantes para indústrias e para o meio ambiente (Banat et al., 2014).

Apesar das inúmeras vantagens, o alto custo do processo de produção e recuperação do produto constituem um entrave para sua utilização em escala industrial (ROCHA, 2009). Contudo, é necessário tornar mais competitivo a produção de biossurfactantes no mercado. Assim, a utilização de matérias primas mais baratas pode viabilizar a sua produção, já que elas contabilizam 30 % do custo global do processo (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Uma alternativa potencial para baratear o custo de produção de biossurfactantes é a utilização de resíduos agroindustriais, compostos com alto teor de carboidratos e lipídios, com nutrientes necessários para o crescimento celular e conseqüentemente para a produção de biossurfactantes (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004). Assim, resíduos ou subprodutos agroindustriais oriundos de culturas que normalmente são realizadas na região tornam-se desejáveis para serem utilizados como fonte nutricional para desenvolvimento de

microrganismos e conseqüentemente, obtenção de produtos como maior valor agregado como, por exemplo, os biossurfactantes.

O bagaço do milho é um subproduto agroindustrial proveniente do processamento úmido do milho, sendo muito utilizado como alimentação suplementar para ruminantes. É composto por carboidratos, aminoácidos, peptídeos e minerais, apresentando grande potencial de uso devido a sua composição e características físico-químicas (NELANIA et al., 2015). Portanto, pode ser utilizado como fonte de carbono, quando se considera a quantidade de amido presente em sua estrutura, ou ainda, como fonte de nitrogênio ao se considerar os aminoácidos presentes. Tornando-se uma excelente fonte nutricional para os meios de cultura de crescimento microbiano. Assim como o resíduo de processamento de milho, outra fonte potencial de nutrientes é a algaroba, leguminosa xerófila, que possui vagem rica em proteína, gordura, vitaminas, sais minerais e, principalmente, sacarose e amido (BORGES, 2004). Por conta dos nutrientes, o resíduo do processamento de milho e o extrato aquoso da algaroba podem ser considerados como boas alternativas de substratos para a produção de biossurfactante (DIAS, 2018; ANDRADE et al., 2019).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar o potencial do meio composto por extrato aquoso de algaroba e do processamento de milho como fonte de carbono e suplemento de nitrogênio, respectivamente, para o crescimento celular e produção de biossurfactante, utilizando a linhagem de *Bacillus subtilis* UFPEDA16, além de analisar a toxicidade do produto utilizando o peixe-zebra como modelo.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial do meio composto por extrato aquoso da algaroba e do resíduo úmido do processamento de milho para produção de biossurfactantes,

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* UFPEDA 16 em meio contendo extrato aquoso da algaroba e do milho;
- Caracterizar o meio composto por extrato aquoso da algaroba e do resíduo úmido do processamento de milho quanto ao teor de açúcar redutor, açúcar redutor total e proteínas;
- Avaliar o crescimento celular e consumo de substrato e produção de biossurfactantes;
- Avaliar o índice de emulsificação de biossurfactantes em compostos hidrofóbicos;
- Avaliar os parâmetros cinéticos do processo de produção de biossurfactantes.
- Avaliar a toxicidade do biossurfactante produzido pela linhagem *B. subtilis* UFPEDA 16, utilizando embriões de peixe-zebra como modelo experimental.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

.3.1 Surfactantes sintéticos

Os surfactantes sintéticos são compostos anfipáticos, ou seja, possui em sua estrutura partes hidrofóbicas, constituída por uma cadeia hidrocarbonada e por uma parte hidrofílica, onde, dependendo do grupo funcional, a estrutura pode ser iônica ou não iônica (NAKAMA,2017).

Por conta das suas características, os surfactantes reduzem as tensões superficiais e interfaciais, e isso se dá, pelo fato do mesmo se acumular entre interfaces de fluidos imiscíveis, formando filmes moleculares e aumentando a solubilidade e mobilidade de compostos apolares (SINGH, 2007). Com isso, essas moléculas apresentam importantes propriedades, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante e umectante, solubilização e dispersão de fases (KOSARIC, 1992).

Devido às suas propriedades, o surfactante move a economia exponencialmente, segundo o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), em 2012, o mercado de surfactantes atingiu cerca de 26,9 bilhões de dólares, com a expectativa de crescimento até 2020 de 4,2%. Isso ocorre por conta da aplicação de surfactantes em diversos setores, incluindo as indústrias de produtos de limpeza, petrolífera, farmacêuticas, e de cosméticos (NITSCHKE; PASTORE, 2006; NAKAMA, 2017)

A grande maioria dos surfactantes comercializados atualmente é sintetizada quimicamente a partir de recursos petroquímicos, matriz não renovável, que é apenas parcialmente biodegradável, causando efeitos prejudiciais ao meio ambiente. (NITSCHKE; PASTORE, 2006; GUDIÑA, 2015). Devido à crescente conscientização ambiental, a demanda por surfactantes obtidos a partir de recursos de base biológica é crescente, como os surfactantes obtidos por meio do metabolismo de microrganismos, conhecidos como biossurfactantes (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015; GUDIÑA, 2015)

3.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são metabólitos sintetizados por diversas espécies de microrganismos, como leveduras e bactérias, geralmente durante a fase de crescimento no ciclo microbiano (MORAES, 2010). Eles possuem propriedades variadas, incluindo a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos, formando micelas e microemulsões entre duas diferentes fases imiscíveis (BANAT et al., 2010; DIAS, 2019). Portanto, conferindo-lhes

características similares aos surfactantes sintéticos (SILVA, 2017) 2017).

3.2.1 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são divididos de acordo com sua estrutura, em classes com compostos de baixo peso molecular, como lipopeptídeos, glicolipídios e proteínas, e polímeros de alto peso molecular, como polissacarídeos, lipoproteínas entre outros (SILVA, 2017).

Além dessa classificação, os biossurfactantes são classificados de acordo com sua origem microbiana, as principais classes incluem: glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Figura 1) (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Essa classificação está relacionada com a capacidade de cada microrganismo de sintetizar um tensoativo biológico diferente e com características específicas. A quantidade e qualidade destes tensoativos biológicos difere de acordo com: o microrganismo produtor, a quantidade de substrato disponível para consumo, a concentração de íons com o nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio de cultivo e, além das condições de operação da cultura como: pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição (BANAT, 1995).

Figura 1: Classificação do biossurfactante.

Tipo de biossurfactante	Microrganismo
<p>Glicolipídios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ramnolipídios • Soforolipídios • Trehalolipídios 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Torulopsis bombicola</i>, <i>T. apícola</i> • <i>Rhodococcus erythropolis</i> • <i>Mycobacterium sp.</i>
<p>Lipopeptídios/ Lipoproteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peptídeo-lipídio • Viscosina • Serrawetina • Surfactina • Subtilisina • Gramicidina • Polimixina 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus licheniformis</i> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Bacillus brevis</i> • <i>Bacillus polymyxa</i>

<p>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ácidos graxos • Lipídios neutros • Fosfolipídios 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Corynebacterium lepus</i> • <i>Nocardia erythropolis</i> • <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<p>Surfactantes poliméricos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Emulsan • Biodispersan • Liposan • Carboidrato-lipídio-proteína Manana-lipídio-proteína 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> • <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> • <i>Candida lipolytica</i> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • <i>Candida tropicalis</i>
<p>Surfactantes particulados</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vesículas • Células 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Fonte: Desai e Banat (1997)

3.2.2 Propriedades dos biossurfactantes

Os diferentes grupos de biossurfactantes exibem diversas propriedades e indicam uma variedade de funções fisiológicas no microrganismo produtor, como:

- **Atividade superficial e interfacial:** As moléculas de água são mantidas juntas por interações intermoleculares, do tipo ponte de hidrogênio, resultando em uma tensão na superfície. Os biossurfactantes, em consequência da sua estrutura, conseguem aumentar a área de umectação, com isso, são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial (água/óleo) do *n*-hexadecano de 40 para 1 mN/m (SANTOS et al., 2016; BAIO, 2015);
- **Tolerância a pH, temperatura, força iônica:** Alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições extremas. Biossurfactantes produzidos por *B. subtilis*, utilizando a manipeira como substrato a 35° C, é estável à temperatura de 100 °C por 140 minutos e a 121 °C por até 60 minutos, à concentração de 2,5 a 20 % de NaCl e

na faixa de pH de 6 a 10 (BARROS, 2008);

- Biodegradabilidade: Diferentes dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os tornam adequados para aplicações em biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN; GIBBS, 1993; NITSCHKE; PASTORE, 2002);
- Especificidade: Biossurfactantes são moléculas complexas com grupos funcionais específicos e, portanto, muitas vezes têm ação específica. Isso é de particular interesse na desintoxicação de diferentes poluentes e na desemulsificação de emulsões industriais, bem como em aplicações alimentícias, farmacêuticas e cosméticas específicas (SANTOS, 2016);
- Outro ponto importante é a possibilidade de produção por meio da utilização de resíduos agroindustriais como substrato, divergindo do sintético, que tem o petróleo como matéria prima, podendo assim, encarecer o valor do produto final (MAKKAR et al., 2011).

3.2.2.1 Toxicidade dos biossurfactantes

Em relação à toxicidade, os biossurfactantes diferem dos surfactantes sintéticos, pois apresentam menor toxicidade em diversos organismos, como exemplo, os glicolípídeos de espécies de *Rhodococcus* 413A foram 50 % menos tóxicas do que Tween 80 em testes de solubilização de naftaleno (KANGA, 1997). Edwards e colaboradores (2003) compararam surfactantes sintéticos e biossurfactantes, utilizando *Menidia beryllina* e *Mysidopsis bahia*, no qual foi possível provar que o Emulsan foi bem menos tóxico que o Triton X-100.

3.3 Produção dos biossurfactantes

A eficiência de um bioprocessamento é a base para qualquer indústria biotecnológica, incluindo aquela voltada para a produção de biossurfactantes. Neste caso, a busca pelo aumento da produtividade demanda a adição de componentes ao meio de cultura que induzirão a máxima ou ótima produtividade (CIAPINA, 2008). Os biossurfactantes podem ser obtidos por bioprocessos simples e sua produção requer geralmente a presença de fonte de carbono, que vai diferenciar as vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para a produção, fonte de nitrogênio no meio de cultura e fatores como aeração, pH e temperatura ótimos (NITSCHKE et al., 2004; SANTOS, 2016). Apesar de possuir muitas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, a produção de biossurfactantes não tem sido muito utilizada, em consequência do

custo do processo e o baixo rendimento do produto (FARIA, 2010). A produção de biossurfactantes ainda tem um custo maior que a produção de seus sintéticos equivalentes, com isso, o grande desafio é traçar estratégias para baratear o processo de produção em larga escala (HUDAK; CASSIDY, 2004).

A utilização de substratos alternativos como resíduos agroindustriais é uma das estratégias atrativas para a produção econômica de biossurfactantes, visto que 10 a 30 % da matéria-prima representa o custo total de um produto biotecnológico (CIAPINA, 2008). Muitos resíduos ou subprodutos agroindustriais, mesmo depois do processamento, ainda são ricos em fontes de carboidratos, lipídeos e nitrogênio essenciais. Logo, a seleção de meio de cultura contendo tais resíduos pode garantir o equilíbrio adequado de nutrientes para permitir o crescimento microbiano e a consequente produção de biossurfactante (SANTOS, 2007; SANTOS, 2016). Os ganhos econômicos líquidos em substituição aos custos de produção e aplicabilidade serão os fatores determinantes para o uso de materiais renováveis na produção de biossurfactantes (MAKKAR, 2011).

Na literatura, há diversos usos de resíduos agroindustriais, correspondendo a fonte de carbono, para produção de biossurfactantes. Barros (2008) observou a produção de surfactina por *B. subtilis* utilizando manipueira. A utilização de óleo de soja e o óleo residual de fritura foi relatada por Castiglioni (2009) e Morais (2012). Outros resíduos também foram analisados como potenciais para produção de biossurfactantes como o soro do leite sendo a principal fonte de nutrientes (VERA, 2017). Em alguns casos, suplementação com fontes de nitrogênio também foi utilizada: milhocina, extrato de levedura, ureia, etc. Logo, a escolha de cada meio dependerá do produto final que se deseja obter (SLIVINSKI, 2007).

3.3.2 *Bacillus subtilis*

Há uma variedade de microrganismos produtores de biossurfactantes, bactérias, leveduras e fungos. Embora a estrutura do *B. subtilis* seja definida pela origem e genética, outros fatores podem influenciar, como as circunstâncias ambientais e natureza do substrato, tendo a produção normalmente como consequência às respostas de condições do ambiente (SAMPAIO, 1995; SOBRINHO, 2007).

Os *B. subtilis* (Figura 2) que são caracterizados morfologicamente por bastonetes gram-positivos aeróbicos é um dos principais microrganismos para produção de biossurfactantes. São responsáveis por produzir biossurfactantes do tipo lipopeptídeos, que podem ser divididos em três famílias compostas por peptídeos cíclicos com diferentes estruturas: surfactina, iturina

(iturinas, micosubtilisinas e bacilomicinas) e fengicina (Figura 3). Estas famílias subdividem-se em isoformas, que diferem na composição dos aminoácidos. As isoformas podem ainda apresentar uma subdivisão em séries homólogas, que variam no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica (BUGAY, 2009).

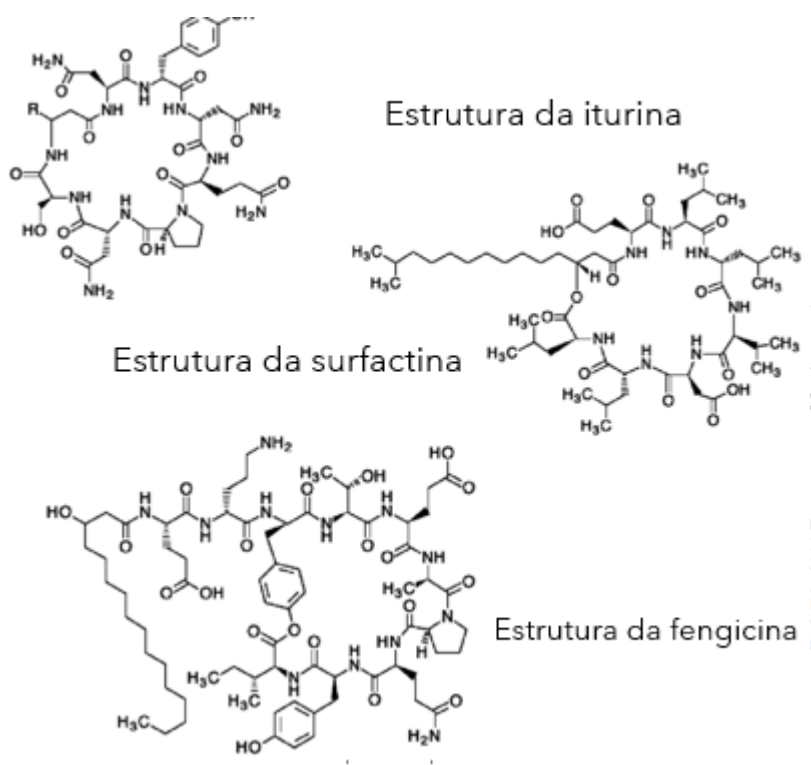
B. subtilis é considerado um microrganismo adequado para a produção de biossurfactante devido à ausência de patogenicidade, classificado como GRAS (*generally regarded as safe*) pelo FDA, o que permite a utilização de seus produtos metabólitos em indústrias alimentícia e farmacêutica, além da habilidade do gênero *Bacillus* de ser capaz de secretar proteínas extracelulares diretamente no meio de cultura, fator importante para a produção de biossurfactantes, antibióticos e enzimas. Logo, sendo responsável pela produção de 60% das enzimas disponíveis no mercado (NEVES et al., 2007; PHAN et al., 2006).

Figura 2: Morfologia do *Bacillus subtilis*.



Fonte: https://www.cambridgecommodities.com/news/view,actibiobs-how-bacillus-subtilis-takes-actibio-to-the-next-level_812.htm

Figura 3: Lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis*



Fonte: Mongkoltharuk (2012)

3.3.3 Surfactina

A surfactina é um antibiótico lipopeptídeo cíclico com um peso molecular de 1,036 (g/mol). Contém uma mistura de vários beta-hidroxi-ácidos graxos com cadeias de 13 a 15 átomos de carbono como sua porção lipídica, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros. Seu principal componente é o ácido 3-hidroxi-13-metil mirístico, que forma um lactona com um heptapeptídeo aniônico (VOLLENBROICH et al., 1997; BARROS, 2007).

A biossíntese mais acentuada da surfactina ocorre na fase estacionária de crescimento do gênero *Bacillus*, devido a deficiência de nutrientes e oxigênio, gerando a ativação de diferentes estratégias de sobrevivência, incluindo síntese de antibióticos, esporulação e produção de enzimas degradativas extracelulares (SANTOS et al., 2019).

É um dos biossurfactantes mais potentes, capaz de reduzir a tensão superficial de 72 a 27,9 mN.m⁻¹ em concentrações de até 0,005 %, sendo mais potente que outros biossurfactantes e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecilsulfato de sódio (SDS) (BARROS, 2007; FARIA, 2010).

A atividade biológica da surfactina depende da sua estrutura, principalmente os diferentes aminoácidos presentes que causam mudanças significativas em suas propriedades devido à modificação da distribuição polar/apolar e/ou da acessibilidade de grupos carboxílicos a cátions (BARROS, 2007). Além das atividades tensoativas, na Tabela 1 pode-se observar outras funções da surfactina.

Tabela 1: Principais funções da surfactina.

Função da surfactina
Bactericida
Fungicida
Antiviral
Agente antitumoral
Inibidor da formação de coágulos fibrinosos
Antimicoplasmático
Veículo para administração de drogas via pulmonar

Fonte: Barros (2007)

3.3.4 Algaroba

A algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) é uma espécie originária do deserto de Piura no Peru e faz parte do gênero *Prosopis* pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* com cerca de 44 espécies (SILVA, 2007). Uma das principais características é sua fácil adaptação em regiões secas, possuindo tolerância à salinidade e a solos com poucos nutrientes, sendo importante para a alimentação de animais daquela área (BRAGA et al., 2009).

Em relação à análise físico-química da algaroba (Tabela 2), é perceptível a predominância do açúcares, principalmente da sacarose, como principal nutriente da espécie, chegando a apresentar em sua composição química de 46% e 29% de sacarose, além de 25-28 % de glicose, 11-17 % de amido, 7-11 % de proteínas, 14-20 % de ácidos orgânicos, pectinas e demais substâncias (SILVA et al., 2007; SILVA, 2020). Deste modo, as vagens de algaroba, concentra-se no seu valor nutritivo, constituindo uma rica fonte de carboidratos com valores de energia bruta comparado com outros resíduos (STEIN et al., 2005).

Tabela 2: Análise físico-química da algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.)

Análises	g.100 g ⁻¹
Umidade	5,8 ± 0,9
Açúcares totais	56,5 ± 0,4
Açúcares redutores	4,6 ± 0,3
Fibra alimentar total	7,2 ± 0,5
Proteínas	9,0 ± 1,5
Cinzas	3,6 ± 0,1
Extrato etéreo	2,1 ± 1,3
Tanino	0,3 ± 0,0

Fonte: Silva (2007)

Por ser uma espécie exótica, a falta de um manejo adequado, ou a adaptação regional da leguminosa, ou ainda, a facilidade de dispersão promovida pelos rebanhos, dentre outros fatores, transforma a algarobeira em problema que gera muitas discussões polêmicas segundo alguns pesquisadores (PEGADO et al., 2006). Logo, para uma possível solução neste impasse seria o estudo de como agregar valor à vagem de algaroba, explorando seu potencial fermentescível para desenvolvimento de produtos com alto potencial biotecnológico.

3.3.5 Resíduo úmido do processamento de milho

O milho (*Zea mays* L.) faz parte da família *Poaceae* e apresenta grande importância para o Brasil, sendo cultivado em várias regiões do país, além de ser um dos três cultivares mais cultivados do mundo, com a produção em quase todos os continentes, sendo sua importância econômica caracterizada pelas diversas formas de sua utilização. Os grãos de milho são compostos por diversos nutrientes, tendo a proteína como um dos principais, chegando a quase 10 %, com uma grande quantidade de aminoácidos essenciais presente (PAES, 2006).

Os resíduos de extração (bagaços) (Figura 4) são uns dos principais coprodutos industriais gerados na agroindustrialização do milho, e são de difícil descarte e utilidade, entretanto, quando utilizados para elaboração de novos produtos podem agregar propriedades funcionais, principalmente relacionadas a fatores nutricionais (Tabela 3) (MARQUES, 2016) .

Com isso, sendo uma alternativa para meios de cultura, visto que há a necessidade de compostos nitrogenados pelos organismos fermentadores, tanto para o crescimento microbiano quanto para a produção de metabólitos, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microrganismos (GOMES, 2013). Além dos nutrientes, outra vantagem é o

custo, visto que o resíduo é um subproduto, portanto, é considerado um composto barato e com ampla disponibilidade.

Figura 4: Resíduo úmido do milho após a moagem.



Fonte: Autoral (2020)

Tabela 3: Análise físico-química do grão de milho.

Grãos e frações do milho	Composição (%)				
	amido	proteína	lipídios	açúcares	cinzas
Grão inteiro	71,5	10,3	4,8	2,0	1,4

Fonte: Paes (2006)

3.4 Parâmetros cinéticos

A cinética dos bioprocessos consiste na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo (FERRARI, 2013).

Por meio dos parâmetros cinéticos é possível quantificar as variáveis do processo, como consumo de substrato, formação de produto, crescimento celular, além de observar a influência das condições de cultivo como temperatura, pH, inibidores, entre outros, resultando na otimização do processo. (FERREIRA, 2003).

Para determinar a velocidade de crescimento, devido ao fato que durante um processo de produção há o aumento da concentração microbiana, utiliza-se a velocidade específica de crescimento (μ_x) (Equação 1) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$\mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

Em que:

dX/dt : variação entre a concentração final (X) e inicial (X_0) de biomassa em função da variação de tempo (t) [$\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$];

x: concentração de biomassa celular no instante t [g.L^{-1}]

μ_x : velocidade específica de crescimento celular [h^{-1}]

E durante a fase exponencial de crescimento microbiano, esta velocidade específica é máxima e constante ($\mu_{x,\text{max}}$). O $\mu_{x,\text{max}}$ pode ser estimado pela linearização dos valores de concentração celular durante a fase exponencial. Além disso, pode-se estimar também o tempo de geração da linhagem durante o cultivo que é dado pela Equação 2 (SCHMIDELL et al., 2001).

$$t_g = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu} \quad (2)$$

Em que:

$\text{Ln}(2)$: Logaritmo natural do número 2

t_g : tempo de geração da linhagem microbiana [h]

μ : velocidade específica de crescimento celular [h^{-1}]

Para avaliar o processo em relação a produtividade em célula, utiliza-se a equação 3, sendo possível observar que a produtividade representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo final de cultivo (t_f) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (3)$$

Em que:

X_m : concentração máxima de células [g.L^{-1}];

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

t_f : tempo final de cultivo [h].

Ademais, é possível quantificar no cultivo o fator de conversão de substrato em células

($Y_{x/s}$), descrito por (SCHMIDELL et al., 2001) sendo expresso na Equação 4, onde X e S representam a concentração de biomassa e substrato, respectivamente.

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

Em que:

X_0 : concentração inicial de biomassa microbiana [g.L^{-1}]

X: concentração final de biomassa microbiana [g.L^{-1}]

S: concentração final de substrato [g.L^{-1}]

S_0 : concentração inicial de substrato [g.L^{-1}]

$Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em células [$\text{g}_x.\text{g}_s^{-1}$]

3.5 *Danio rerio*

O *Danio rerio* (Figura 5), mais conhecido como peixe-zebra, é um peixe de porte pequeno e de água doce, o qual pertence à família *Cyprinidae*, sendo composto por cerca de 44 espécies. Seu corpo é fusiforme e comprimido lateralmente, possuindo listras de cores alternadas e com uma boca oblíqua terminal voltada para cima (GERLACH, 2008).

A reprodução do peixe-zebra ocorre de forma externa, produzindo numerosas proles, podendo alcançar até 300 ovos em 3 dias. Além de possuir um ciclo de vida curto, precisando apenas de 48 a 72 horas para evoluir do estado de ovo para larva, se tornando adulto aos 3 meses de vida e tendo a capacidade de sobreviver por cerca de 3 anos (SILVEIRA et al., 2011; MARTINS, 2017).

Devido às características importantes como seu tamanho pequeno, menor preço em relação a outros organismos modelo, rápido desenvolvimento e tempo de geração, fácil manejo, dimorfismo sexual, transparência dos embriões, genoma totalmente sequenciado e disponível em bancos de dados públicos e homologia genética com humanos, o peixe-zebra tem sido usado como modelo experimental em diversas áreas, como exemplo podemos visualizar na área toxicológica (LAWRENCE, 2007).

3.5.1 *Danio rerio* como organismo modelo para toxicidade

Na área de toxicidade, o peixe-zebra é muito utilizado principalmente por conta da transparência do embrião, sendo importante para a visualização durante o processo, da sua sensibilidade e por múltiplos parâmetros fenotípicos e bioquímicos que avaliam a potencial

toxicidade, além da mortalidade gerada por substâncias (WANG, 2016). Além de ter uma grande correlação com estudos feitos com mamíferos, que pode ser comprovado por Yamashita e colaboradores (2014) que analisaram substâncias teratogênicas, tendo taxas de concordância das duas espécies de até 90 %.

A ecotoxicidade consiste no estudo do efeito de substâncias em organismos vivos, e vem utilizando com frequência o embrião do peixe-zebra como organismo modelo, principalmente, pelo fato da capacidade de bioacumulação em tecidos, sendo possível identificar substâncias tóxicas ao meio ambiente aquático (CAVALCANTE, 2017). Como exemplo de ecotoxicidade, está o estearamidopropil dimetilamina (SAPDMA), um surfactante sintético, no qual foi possível visualizar uma alta mortalidade e disfunções fenotípicas no peixe-zebra (AL JAMAL et al., 2020)

Figura 5: Morfologia do Peixe-zebra.



Fonte: Behavioral Research Blog (2012)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substrato

4.1.1 Extrato aquoso da algaroba

O extrato aquoso da algaroba foi obtido seguindo a metodologia descrita por Dias (2019), que consistiu na seleção das vagens de algaroba de acordo com o melhor estado de conservação, descartando as vagens danificadas, atacadas por insetos e roedores, fungos. Após seleção, as vagens foram sanitizadas com hipoclorito de sódio a 1% (v/v), em seguida sendo lavada em água destilada para retirada do excesso de sanitizante.

Após esse processo, houve a quebra das vagens em tamanhos regulares de aproximadamente 2cm, e posteriormente, para o processo de hidratação, com água destilada numa proporção de 1:2 (Vagem:Água), a 80 °C, por aproximadamente 4 horas.

A extração do extrato aquoso foi realizada utilizando os fragmentos hidratados, os quais foram submetidos a operações de prensagem (Figura 6), em prensa-hidráulica manual, a uma pressão de 10 Kgf/cm², onde foi possível a obtenção e separação do extrato aquoso e do resíduo sólido. Por fim, foi realizada uma filtração a vácuo, em funil de Büchner, usando papel filtro qualitativo para separar os resíduos ínfimos presentes no extrato aquoso.

Figura 6: Prensagem das vagens da algaroba.



Fonte: Dias (2019).

4.1.2 Resíduo úmido da maceração do milho

O resíduo úmido da maceração do milho foi disponibilizado por fabricantes locais de canjica e pamonha (Cidade de João Pessoa-PB). O extrato aquoso do resíduo da maceração do milho foi obtido pela adição de 100 g de macerado de milho em 100 mL de água destilada a 70 °C e deixado em repouso por 1 hora, para decantação dos resíduos do macerado ainda presentes. Após esse processo, o líquido resultante da decantação foi filtrado em papel de filtro qualitativo de 14µm, o filtrado obtido foi denominado extrato aquoso da maceração de milho utilizado nos experimentos como fonte de nitrogênio para o cultivo.

4.1.3 Caracterização química dos substratos

A caracterização química do extrato aquoso da algaroba e do macerado de milho foi realizada quanto à quantidade de açúcares redutores totais (ART) e açúcar redutor (AR).

4.1.3.1 Teor de açúcares redutores totais (ART)

Para determinação dos açúcares redutores totais utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada e, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi obtida realizando o teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de glicose 0 g/L até 1 g/L. Com os valores de absorbância obtidos, foi construída a curva de absorbância versus concentração

Por ser um meio rico em sacarose, devido a algaroba, é necessário a realização de hidrólise ácida para determinação dos açúcares redutores totais. A hidrólise ocorreu com a introdução de 1 mL do extrato aquoso diluído (1:8), 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl - 2M) em um balão volumétrico de 50 mL. O balão foi posto ao banho termostatizado (Banho maria SL 150 - SOLAB) por 10 minutos a 70 °C, em seguida foram adicionados 2mL de hidróxido de sódio (NaOH - 4M) e completado o volume do balão com água destilada para esfriar a amostra. Em seguida, adicionou-se em tubos de ensaio 0,5 mL do extrato hidrolisado e 0,5 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os tubos foram levados ao banho termostatizado a 100 °C por 15 minutos. Após o banho termostatizado, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos. Para finalizar, adicionou-se 4ml de água destilada à 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 e a diluição foi considerada para fins de processo.

4.1.3.2 Teor de açúcares redutores (AR)

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito por Santos (2007), porém sem o processo de hidrólise ácida. Foi utilizado 0,5 mL da milhocina e da algaroba e 0,5 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os tubos foram levados ao banho termostaticado a 100 °C por 15 minutos. Após o banho termostaticado, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 minutos. Para finalizar, adicionou-se 4ml de água destilada à 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 e a diluição foi considerada para fins de processo

4.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a linhagem *Bacillus subtilis* UFPEDA16, cedido pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantido no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da Universidade Federal da Paraíba.

A linhagem foi mantida em tubos inclinados com o meio ágar Lúria-Bertani (LB), composto por triptona/peptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), NaCl (5 g/L) e ágar (20 g/L). O repique celular foi realizado periodicamente em tubos e incubados a 37°C durante 24 horas para o crescimento e, em seguida, armazenados a 4 °C para conservação.

4.3 Padronização do pré-inóculo

Para padronizar o pré-inóculo, foram utilizados dois Erlenmeyers (250 mL) em uma incubadora rotativa orbital (200 rpm e 37 °C), com 100 mL de meio de cultivo cada, contendo 20% (v/v) do extrato aquoso de algaroba e 10 % (v/v) do extrato aquoso do macerado de milho Após autoclavar por 15 minutos a 121 °C e resfriar o meio, houve a transferência do microrganismo para o meio de crescimento, em ambiente asséptico, com auxílio de uma alça de platina, retirando assim as colônias de bactérias crescidas dos tubos inclinados para os frascos contendo o meio de cultivo. Para acompanhar o crescimento, foi utilizado um espectrofotômetro para determinar a densidade óptica do cultivo (600 nm), e ao chegar a

densidade óptica desejada (0,6 a 0,8), 10 % (v/v) do conteúdo foi inoculado para a produção de biossurfactantes.

4.4 Processo de produção de biossurfactantes

Foram realizados experimentos em incubadora rotativa orbital utilizando como meio de cultivo o extrato aquoso de algaroba como substrato e o extrato aquoso do macerado de milho como suplementação de nitrogênio, a uma concentração de 20 % e 10 % (v/v) respectivamente. Nesses cultivos foram analisados o crescimento microbiano, a concentração de substrato, concentração de biossurfactante bruto e o índice de emulsificação.

4.4.1 Cultivo

O cultivo foi feito em duplicata, utilizando Erlenmeyers (Figura 7) com o volume de 100 mL (90 mL de meio/10 mL do pré-inóculo), em uma incubadora shaker (SOLAB - 223), com 200 rpm de agitação, e com temperatura de 37° C, sendo observada e analisada durante 72 horas de cultivo. O caldo produzido foi centrifugado (3500 rpm/15 minutos a 4°C) para separação das células e o sobrenadante armazenado em tubos de centrífuga (Falcons) de 50 mL para as análises posteriores.

Figura 7: Meio para o cultivo contendo 10 % de resíduo úmido do milho e 20% de extrato aquoso da algaroba antes de ocorrer a inoculação



Fonte: Autoral (2020)

4.6 Análises do processo de produção de biossurfactantes

Em tempos regulares, as amostras retiradas foram analisadas quanto à concentração de células, concentração de substrato (açúcares redutores totais e proteínas) e produção do biossurfactante, e determinação dos parâmetros cinéticos.

4.6.1. Concentração de biomassa microbiana

O crescimento microbiano foi acompanhado através do método turbidimétrico (600 nm) e gravimétrico por peso seco (Figura 8). O peso seco consistia em adicionar 2 mL de caldo fermentado a um microtubo previamente pesado, centrifugá-la (10.000 rpm por 10 minutos – MiniSpin - Eppendorf) e, ao final da centrifugação, descartar o sobrenadante. O *pellet* sedimentado foi levado a estufa (OLIDEF-35CZ) a 80 °C por 24 h. 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 (5).

$$\text{Peso seco (g/mL)} = \frac{(\text{massa do tubo} + \text{pellet livre de umidade}) - (\text{massa do tubo})}{\text{volume de amostra}} \quad (5)$$

Figura 8: Processo de determinação do peso seco.

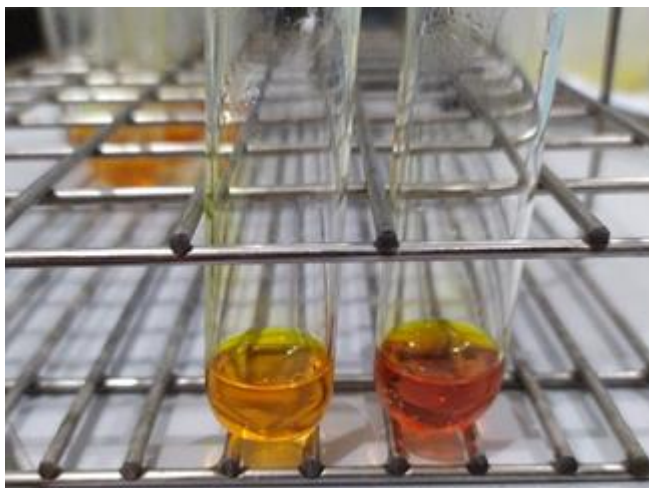


Fonte: Autoral (2020)

4.6.2 Quantificação do substrato

A quantificação do substrato foi realizada pela análise do caldo fermentado isento de células, para determinação de açúcares redutores totais, utilizando o reagente DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) (MILLER, 1959), conforme descrito no item 4.1.3.1, e a quantificação de proteína utilizando o método de Bradford (1976)

Figura 9: Amostras hidrolisadas com adição do DNS, a da esquerda é a amostra com 60 horas de cultivo, e a da direita consiste na amostra com 0 horas de cultivo.



Fonte: Autoral (2020)

4.6.2.1 Quantificação de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas totais solúveis foi realizada seguindo a metodologia de Bradford (1976). O método de Bradford utiliza o corante de *coomassie brilliant blue* BG-250, que proporciona a interação com as macromoléculas de proteínas contendo aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas.

Uma alíquota de 100 μL dos sobrenadantes foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford previamente preparado (Figura 10). A mistura foi agitada e após 10 min. foram feitas leituras num comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro. A concentração foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) em NaCl 0,9 %.

Figura 10: Amostras com adição do *coomassie brilliant blue* para análise de proteínas solúveis. Tubo da esquerda: amostra de 12 horas de cultivo, e a da direita: amostra de 60 horas de cultivo.



Fonte: Autoral (2020)

4.6.3. Quantificação do biossurfactante produzido

Para a obtenção da curva de concentração de biossurfactante, foi realizado o método da precipitação ácida associado ao método gravimétrico, em que foi adicionado 10 mL de meio de cultivo livre de células a um tubo de 50 mL, previamente pesado. Já no tubo, foi realizada a precipitação ácida, onde o meio de cultivo livre de células foi acidificado, com HCl (6M), até pH 2 e mantido overnight a 4 °C. Em seguida, o meio acidificado foi centrifugado a 4000 rpm, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi levado a estufa (OLIDEF-CZ) a 80 °C por 24 h. Em seguida, o *pellet* livre de umidade foi pesado. O peso seco foi determinado de acordo com a equação 4.

4.6.4 Purificação do produto

Para a purificação do produto, foi utilizada a metodologia do item 4.6.3. Após a precipitação ácida, o composto foi centrifugado (15 minutos/3500 RPM), o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi ressuspenso em 8 mL de água destilada deionizada pH 8,0. Após esse processo, realizou-se então uma extração líquido-líquido com uso do diclorometano (1:1) em funis de separação, utilizando 8 mL do produto e 8 mL de diclorometano. Agitou-se

por 5 minutos, seguido de 1 hora de repouso para a separação das fases, após esse processo, foi retirada a fase mais densa em tubos de 50 mL para o armazenamento. Após a ressuspensão em clorofórmio, foi adicionado o metanol nas mesmas proporções do clorofórmio, com isso, a mistura foi deixada em repouso para a decantação da surfactina. Após o repouso, foi retirado o excesso dos solventes e levado à estufa para evaporar todo o solvente (Figura 11).

Figura 11: Processo de extração do biossurfactante



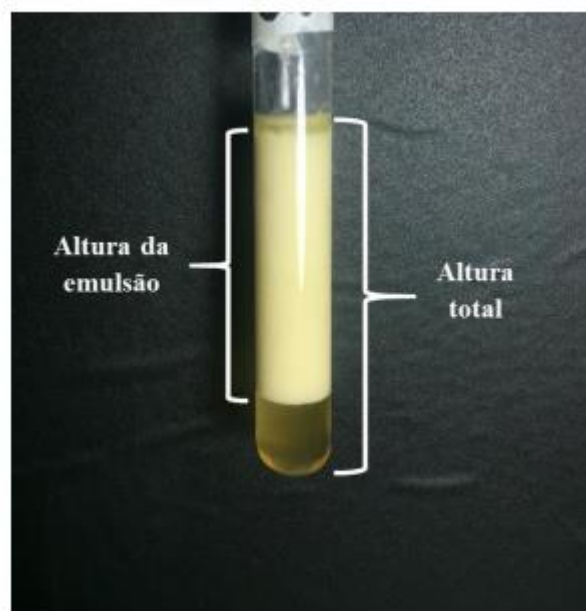
Fonte: Autoral (2020)

4.8 Índice de emulsificação

Para analisar o índice de emulsificação foi utilizado o método segundo Cooper e Goldberg (1987). A análise consistiu em misturar 4 mL do sobrenadante da cultura de microorganismos de cada amostra a 6 mL de óleo vegetal e óleo de motor, obtidos de vias comerciais, separadamente em tubos de ensaio de 15 mL que posteriormente 35 foram agitados vigorosamente em vortex (modelo KMC- 1300V Vortex Mixer VIXAR) por 1 min e deixados a 30 °C por 24 h. O índice de emulsificação (Equação 6) foi então determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100 (Figura 12).

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

(6)

Figura 12: Índice de emulsificação

Fonte: Dias (2019)

4.9 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos avaliados foram a velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), produtividade em células (P_x), tempo de geração (t_g), fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e foram calculados pelas equações apresentadas citadas anteriormente.

4.10 Obtenção dos embriões e larvas de peixe-zebra

Embriões de peixe-zebra, da linhagem selvagem AB, com aproximadamente 3 h pós-fertilização (hpf) foram obtidos na UniPOM (Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e mantidos em meio embrionário E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, MgSO₄ 0,33 mM, azul de metileno 5-10 %) em ambiente com temperatura (26 ± 1 °C) e fotoperíodo (14:10 h claro/escuro) controlados.

Para a obtenção dos embriões, dois machos e duas fêmeas foram acondicionados no dia anterior num dispositivo de acasalamento (Figura 13), e no dia posterior, 1 hora após as luzes do biotério serem acesas, os embriões foram coletados e analisados utilizando um microscópio de luz invertida (Televál 31, Zeiss), para visualizar a viabilidade e o estágio de desenvolvimento do embrião. Embriões e larvas mortas e excedentes foram eutanasiados com overdose de óleo de cravo da Índia e, em seguida, mantidos congelados para posterior incineração.

Todos os protocolos realizados com peixe-zebra neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da UFPB, com certificado de aprovação N° 4460140920

Figura 13: Dispositivo de acasalamento para coleta facilitada de embriões de peixe-zebra.



Fonte: Pereira (2017)

4.9.1 Exposição do biossurfactante aos embriões de peixe-zebra

A exposição ocorreu seguindo as diretrizes do guia 236 da OECD (2013), denominado de teste de Toxicidade Aguda em Embriões de Peixes (FET), com algumas modificações. O teste foi realizado em uma placa de 96 poços, onde foram utilizados 20 embriões, um em cada poço, com 3 hpf expostos individualmente a 100 mg/L (Teste limite) da surfactina diluída em meio E3, contendo ao todo 300 μ l, durante 96 horas. Foi preparada uma placa controle, contendo o mesmo número de embriões expostos somente ao meio E3. A cada 24 horas, os embriões foram analisados quanto à presença de dos seguintes sinais de letalidade: (a) coagulação embrionária; (b) não desprendimento da base da cauda; (c) ausência de formação de somitos e (d) ausência de batimentos cardíacos. Além disso, a presença de quaisquer outros efeitos não letais também foi verificada. O número de embriões/larvas mortas ou afetados foi utilizado para cálculo do % de mortalidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do meio

Os extratos aquosos da algaroba e do macerado de milho foram caracterizados quanto ao teor de açúcares redutores totais (ART), açúcares redutores (AR) . A caracterização dos componentes do substrato está nas Figuras 14 e 15.

Figura 14: Caracterização química do extrato aquoso da algaroba e do extrato aquoso do resíduo úmido do processamento do milho.

	Açúcares redutores totais (g/L)	Açúcares redutores (g/L)
Extrato da algaroba	41,2	14,04
Água da extração do processamento úmido do milho	24,1	13,61

Fonte: Autoral (2020)

Figura 15: Caracterização química do meio contendo o caldo da algaroba e do extrato aquoso do resíduo úmido da maceração do milho

	Açúcares redutores totais (g/L)
Meio composto por 20% de extrato de algaroba e 10 % da água da extração do processamento úmido do milho	41,2

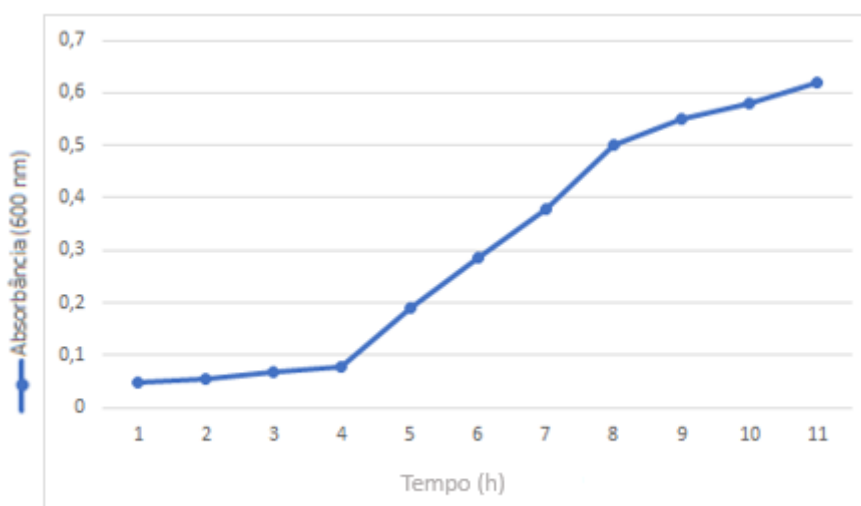
Fonte: Autoral (2020)

Silva e colaboradores (2007) observaram a concentração de 4,6/100 g, equivalente a 46 g/L de açúcares redutores totais na farinha da algaroba, derivado principalmente da sacarose, e Gomes (2013), observou uma concentração de açúcares redutores de 12,8 g/L na milhocina, que consiste na água de maceração do milho, sendo assim, valores semelhantes ao presente trabalho.

5.2. Cultivo em incubadora rotativa orbital

Para determinar o tempo necessário de crescimento, ou fase exponencial, pode-se observar o aumento da densidade óptica. Configura-se que a linhagem está adaptada ao meio de cultivo analisado quando o crescimento por turbidimetria alcança uma densidade óptica em torno de 0,6 e 0,8 a 600 nm. Assim, foi realizada a padronização do inóculo, como descrito no item 4.3.5.2. O tempo que a linhagem de *B. subtilis* atingiu uma densidade óptica de 0,62 foi de aproximadamente 11 h, como ilustrado na Figura 16. Portanto, o pré-inóculo estava pronto para ser adicionado ao processo.

Figura 16: Padronização do inóculo.



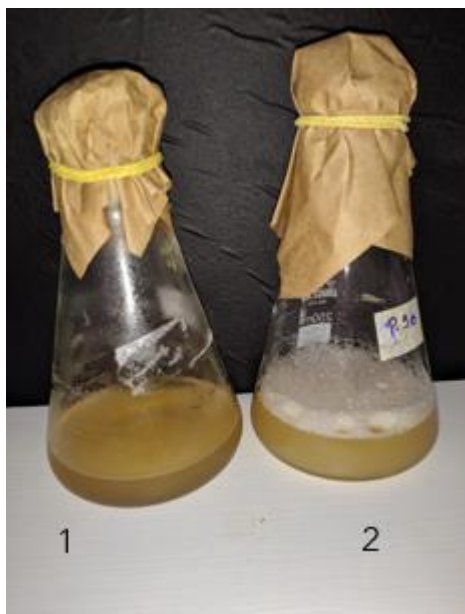
Fonte: Autoral (2020)

O cultivo foi realizado em duplicata, utilizando ao todo 22 erlenmeyers. Em todos os cultivos, as características do meio de cultivo sofreram alterações visuais (Figura 17). O meio, antes de ser inoculado, apresentava uma coloração translúcida amarelo claro, mas, no decorrer do processo fermentativo, foi adquirindo turbidez e formação de espuma, tais alterações foram promovidas pelo aumento do crescimento celular e produção do biossurfactante, respectivamente. O aroma também foi alterado para o cheiro característico do processo fermentativo.

Os processos foram analisados quanto à concentração de células, consumo do substrato e produção do biossurfactante. Para o cultivo foi construído perfis gráficos da concentração

celular e consumo de substrato em função do tempo, e um outro do consumo de substrato e densidade óptica em função do tempo, e a produção do biossurfactante e proteínas totais em função do tempo para análise cinética.

Figura 17: Aumento da turbidez promovido pelo crescimento microbiano e formação de espuma decorrente da produção do biossurfactante. Erlenmeyer 1: meio sem a inoculação (controle); Erlenmeyer 2: meio após 60 horas de processo



Fonte: Autoral (2020)

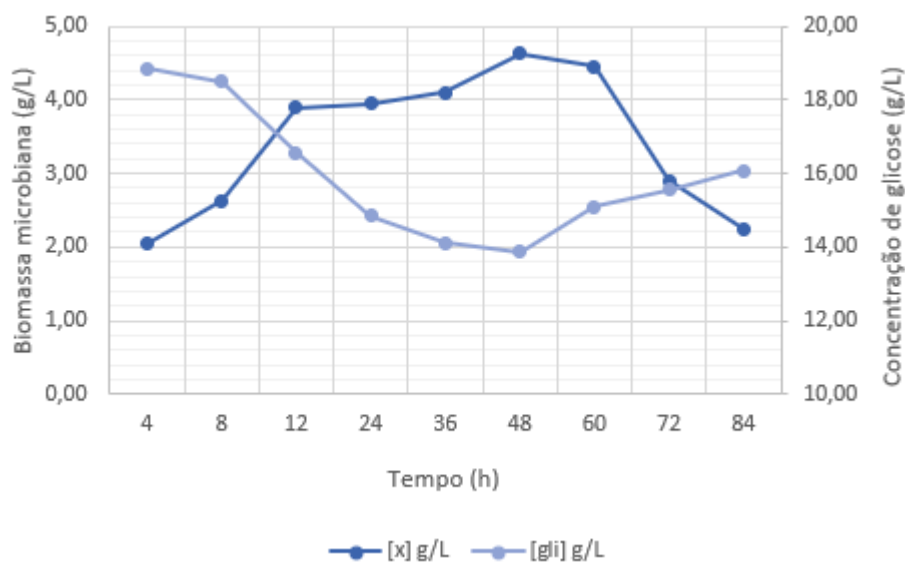
5.3 Análises cinéticas do processo, consumo de substrato e formação de produto

O perfil cinético do cultivo foi demonstrado nas Figuras 18, 19 e 20. Na Figura 18, é possível observar o consumo do substrato e o crescimento bacteriano. Em relação ao consumo de substrato, em 36 horas, foi possível observar uma concentração de 13,79 g/L, tendo um consumo máximo de aproximadamente 6,2 g/L, sendo um resultado semelhante ao descrito por Dias (2019), que observou um consumo de aproximadamente 8 g/L, utilizando extrato de algaroba e extrato de levedura. Em relação à concentração celular, houve um crescimento exponencial de 0 até 24 horas de processo, em que a concentração máxima de células foi de 4,64 g/L. A alta concentração de biomassa, além do crescimento, pode ter sido originado do amido residual advindo do extrato aquoso do macerado de milho, porém, ainda pode-se observar o crescimento microbiano

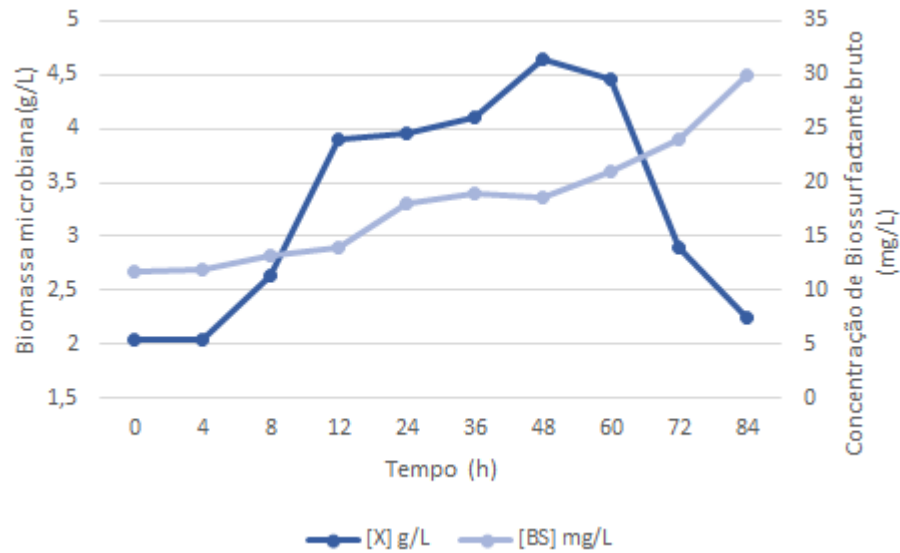
Na Figura 19 foi possível observar a concentração celular e a concentração de biossurfactante. É possível observar a produção de biossurfactante em relação ao crescimento microbiano, obtendo uma concentração máxima de 30 mg/L de produto as 84 horas.

Na Figura 20, foi possível observar o aumento das proteínas totais, em consequência do aumento do biossurfactante do tipo lipopeptídeo, cuja característica estrutural está na presença de aminoácidos em sua região polar. Portanto, é perceptível o aumento das proteínas assim como aumento do biossurfactante, chegando a 152 mg/L de proteína. Santos (2009) também associou o aumento de proteína com a produção de surfactina, utilizando o gênero *Bacillus*. Sari (2019) detectou a presença de aminoácidos, utilizando a quantificação proteica por Bradford (1976), que advém das estruturas proteicas do biossurfactante produzido. Com isso, pode-se associar o aumento da absorvância e consequentemente das proteínas totais, proveniente da produção do biossurfactante.

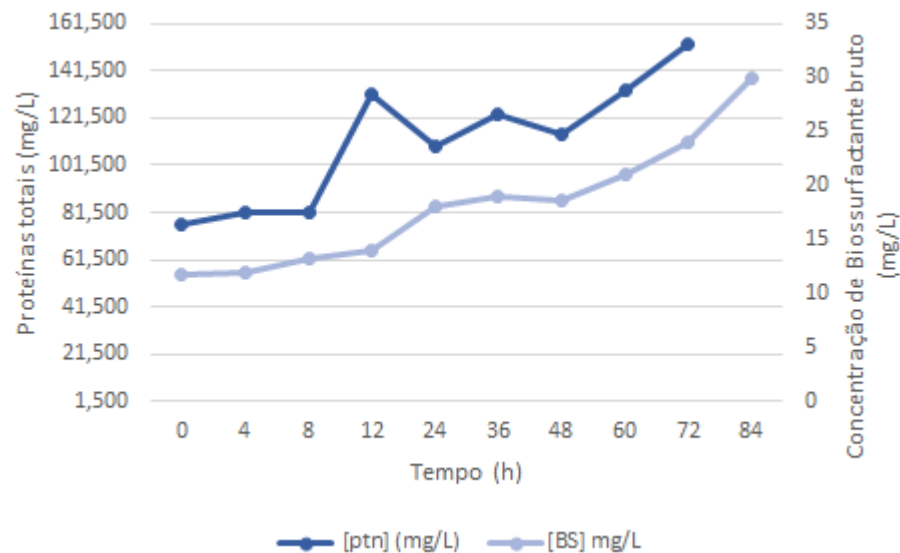
Figura 18: Curvas de crescimento bacteriano e consumo do substrato.



Fonte: Autoral (2020)

Figura 19: Curvas de crescimento microbiano e concentração de biossurfactante.

Fonte: Autoral (2020)

Figura 20: Curva de concentração de proteínas totais e concentração de biossurfactante.

Fonte: Autoral (2020)

5.4. Caracterização de biossurfactante

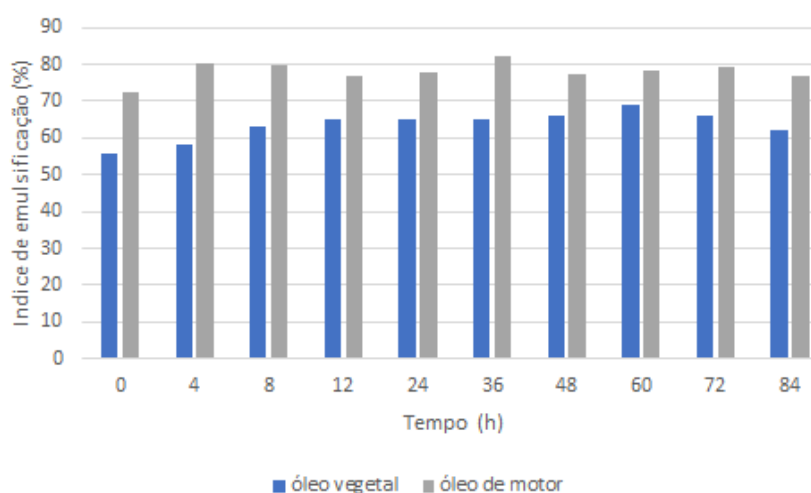
A Figura 21, indica os percentuais de emulsificação do sobrenadante produzido pela linhagem *B. subtilis* (UFPEDA 16) após 24 horas, utilizando o óleo vegetal e óleo de motor, com o objetivo de analisar a emulsão no decorrer do tempo, onde, foi observado a formação da emulsificação, evidenciando a presença de biossurfactante nos cultivos (Figura 23).

Em relação ao óleo vegetal, podemos destacar a amostra de 60 horas, o qual foi observado um índice de emulsificação de 69 % às 24 horas. Enquanto no óleo de motor, o maior índice de emulsificação foi na amostra de 36 horas, chegando a 82 %.

Alguns estudos relatam que, para que uma emulsificação seja eficaz, o seu índice de emulsificação deve ser superior a 40 % (YOUSSELF, 2004; DIAS, 2017). Assim, o presente estudo apresentou resultados satisfatórios, já que se obteve valores maiores que 40 %. Outro ponto importante, é que além de ter proporcionado altas taxas de emulsificação, as emulsões se mantiveram estáveis por 24 horas, certificando que o *B. subtilis* é um bom produtor de biossurfactante.

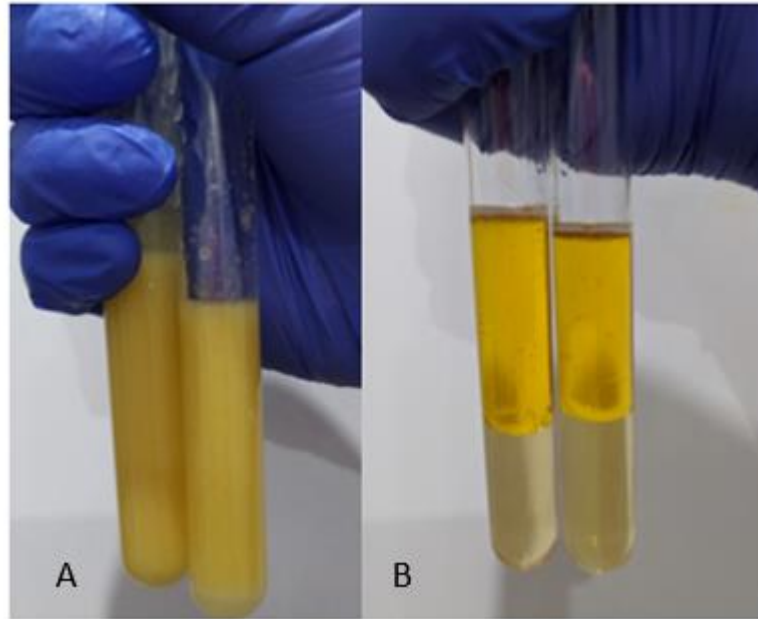
Silva (2017) utilizando a *B. safensis* em sacarose, observou uma porcentagem máxima de emulsificação de 60 % em óleo de motor, e Sousa (2011) observou a taxa de emulsificação de 53,3% e 43,3% em n-hexadecano e óleo de soja respectivamente em 72 horas. Com isso, os resultados do presente trabalho são promissores em relação aos descritos na literatura.

Figura 21: Índices de emulsificação do óleo vegetal e de motor.



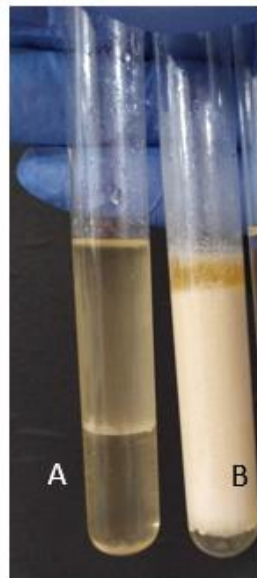
Fonte: Autoral (2020)

Figura 22: Amostras para determinação do índice de emulsificação. Figura A: amostra com óleo vegetal durante a agitação; Figura B: amostra com óleo vegetal antes da agitação.



Fonte: Autoral (2020)

Figura 23: Emulsificação no óleo vegetal e óleo de motor. Tubo A: emulsificação com óleo vegetal; Tubo B: emulsificação com óleo de motor.

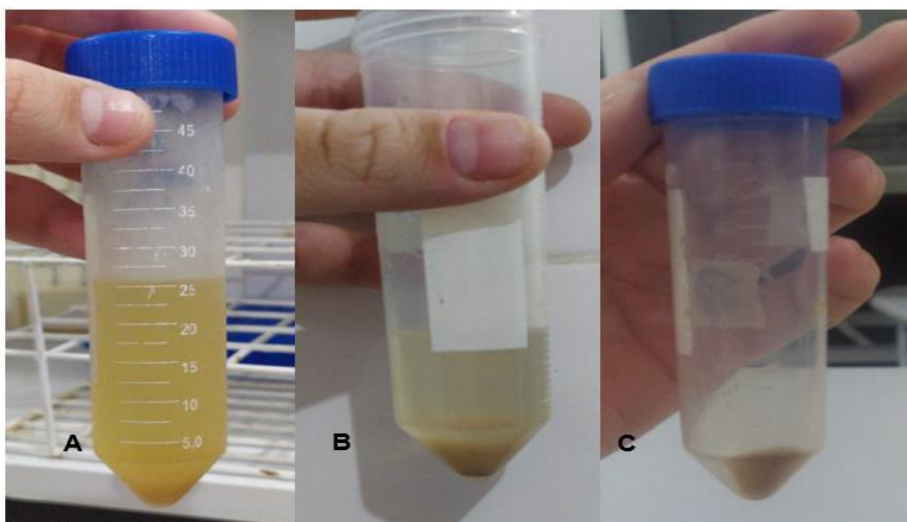


Fonte: Autoral (2020)

5.5 Extração e purificação do biossurfactante

Após o momento em repouso a 4° C, o meio livre de células foi centrifugado e retirado o sobrenadante. O pellet presente foi diluído em água deionizada pH 8 e a solução foi levada para o funil de separação para ocorrer a extração líquido-líquido e posterior secagem do solvente, como discutido no item 4.6.4 (Figura 24).

Figura 24: Extração do bioproduto. Figura A: sobrenadante após as 12 horas de precipitação ácida. Figura B: sobrenadante acidificado após a centrifugação. Figura C: bioproduto após a retirada do sobrenadante



Fonte: Autoral (2020)

Figura 25: Extração líquido-líquido. Figura A: extração utilizando diclorometano; Figura B: extração utilizando clorofórmio.



Fonte: Autoral (2020)

5.6 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos obtidos do processo de produção de biossurfactantes estão mostrados na Figura 26. Pode-se observar que durante a fase exponencial identificada de 0-48h, a velocidade máxima de crescimento microbiano foi de $0,0174 \text{ h}^{-1}$, o que permitiu estimar o tempo de geração de 39,83 h. A partir desses parâmetros foi possível perceber que a linhagem ainda precisa de melhores condições de cultivo, como um maior tempo de cultivo, maior concentração de substrato, maior índice de aeração, e até mesmo a utilização de biorreatores.

Figura 26: Parâmetros cinéticos determinados durante a fase exponencial de crescimento microbiano

Parâmetros cinéticos	<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 16
μ_{max} (h^{-1})	0,0174
Tg (h)	39,83
Px ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$)	0,0538
Yx/s (gx/g s)	0,0517

Fonte: Autoral (2020)

Pinto (2019) analisou a produção de biossurfactantes utilizando uma cultura mista contendo *Corynebacterium sp.*, e linhagens de *Bacillus*, com a glicose como fonte de carbono,

e observou a velocidade máxima de crescimento específico (μ_{\max}) de 0,010, sendo um valor menor que o apresentado no trabalho, assim, pode-se afirmar que apesar de apresentar um μ_{\max} menor que de alguns artigos na literatura, a linhagem de *B. subtilis* UFPEDA 16 adaptou-se ao meio, mesmo sendo um meio composto apenas por resíduos, com a ausência de compostos químicos. Outro fator importante foi a produtividade em células (Px), onde Dias (2019), observou valores de 0,0244, utilizando linhagens de *Bacillus* sp., também apresentando valores menores que o trabalho atual. Porém, houve uma baixa conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) com um valor de 0,0517 gx/gs de acordo com alguns estudos (DIAS, 2018; ANDRADE et al., 2019). Observação leva a considerar que, apesar da adaptação do crescimento da linhagem no meio proposto, deve-se analisar outras condições de cultivo como melhorar a relação substrato e fonte de nitrogênio, razão de aeração e tempo de processo.

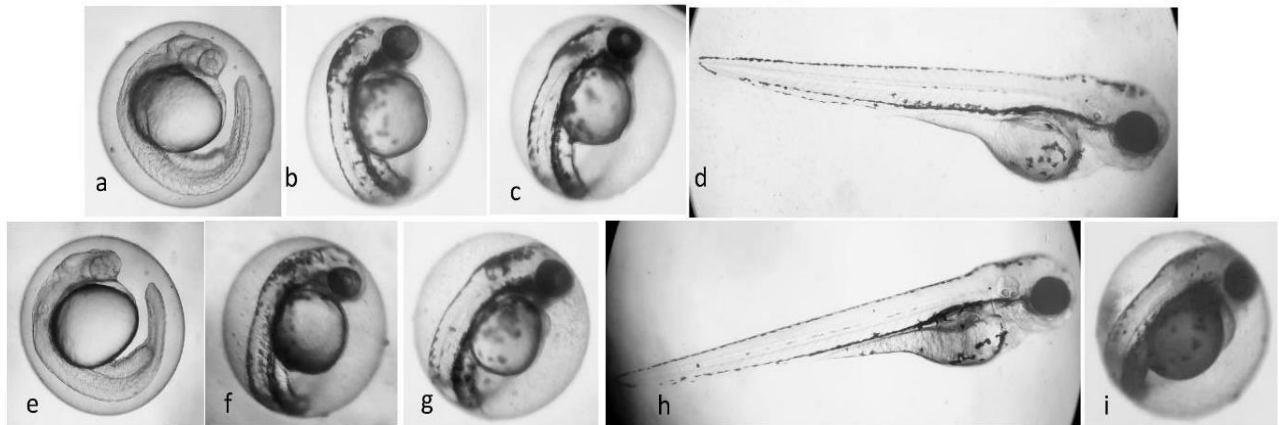
5.7 Análise da toxicidade em embriões de peixe-zebra

O teste durou 96 horas, utilizando uma concentração de 100 mg/L do biossurfactante. Durante as primeiras 72 horas, não foi observado nenhum efeito adverso, mortalidade ou alterações fenotípicas nos embriões. Porém, às 96 horas, foi possível observar 15 % de mortalidade na placa teste, com 5 % decorrente de ausência de batimento cardíaco e 10 % advinda da coagulação do ovo. Em relação aos efeitos não letais, foi verificado que 15 % dos embriões apresentaram atraso na eclosão. Todos os controles sobreviveram sem nenhum efeito adverso (Figura 27).

Tendo em vista os resultados obtidos, a toxicidade do biossurfactante foi considerada baixa, visto que apresentou taxa de mortalidade de 15 % de mortalidade, mesmo expondo os animais a uma concentração considerada como limite pela OECD. É possível inferir que a CL_{50} da surfactina para embriões de peixe-zebra, após 96 h de exposição, é maior que 100 mg/L. Para fins comparativos, Feng (2009) testou a toxicidade de alguns surfactantes sintéticos amplamente utilizados, como SDS (Dodecil sulfato de sódio) e betaína, em embriões de peixe-zebra, e foi possível observar um CL_{50} de 8,25 mg/L e 0,872 mg/L respectivamente.

Sendo assim, o biossurfactante produzido foi muito menos tóxico que os comercializados atualmente, com isso, uma opção para a utilização do mesmo em larga escala.

Figura 27: Embriões de peixe-zebra expostos à surfactina.



Toxicidade aguda da surfactina em embriões de peixe-zebra expostos por 96 h à concentração de 100 mg/L (teste limite). (a), (b), (c) e (d) Organismos controle apresentando um desenvolvimento normal depois de 24, 48, 72 e 96 hpf (horas pós-fertilização), respectivamente, expostos apenas ao meio embrionário E3. (e), (f), (g) e (h) Embriões expostos à surfactina, com o desenvolvimento normal, após 24, 48, 72 e 96 hpf. (i) Larva, com 96hpf, tratada com surfactina, apresentando um atraso na eclosão (< 15% do embriões apresentaram efeitos adversos).

Fonte: Autoral (2020)

6 CONCLUSÃO

No presente estudo pode comprovar a capacidade da linhagem *B. subtilis* (UFPEDA 16) em produzir biossurfactantes utilizando o extrato aquoso da algaroba como substrato, suplementado com extrato aquoso do macerado de milho, mostrando-se como meio de cultivo promissor. O biossurfactante produzido demonstrou uma ótima atividade emulsificante, visto que, foi capaz de emulsificar o óleo vegetal e o óleo de motor e manter essa emulsificação estável por pelo menos 24 horas. Os parâmetros cinéticos obtidos puderam confirmar a adaptação das células no meio de cultivo utilizado, apesar de necessitar de novos estudos para otimizar aspectos do processo, porém, foi possível verificar a produção do biossurfactante, mesmo utilizando apenas resíduos agroindustriais, sem a suplementação de nutrientes. Foi possível analisar, ainda, a baixa toxicidade do biossurfactante em relação aos surfactantes sintéticos, sendo assim, uma alternativa para uso em indústrias e na área da biorremediação.

Por fim, para dar segmento ao estudo, sugere-se realizar experimentos em biorreator de bancada para aumentar a produção do biossurfactante, além de estudar a relação substrato e fonte de nitrogênio, razão de aeração e tempo para otimizar o processo.

REFERÊNCIAS

AL-JAMAL, Ola; AL-JIGHEFEE, Hadeel; YOUNES, Nadin; ABDIN, Roba; AL-ASMAKH, Maha A.; RADWAN, A. Bahgat; SLIEM, Mostafa H.; MAJDALAWIEH, Amin F.; PINTUS, Gianfranco; YASSINE, Hadi M. Organ-specific toxicity evaluation of stearamidopropyl dimethylamine (SAPDMA) surfactant using zebrafish embryos. **Science of The Total Environment**, [S.L.], v. 741, nov. 2020.

ANTUNES, Adriana Almeida et al.,. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Agroecology**, Recife, v. 80, n. 3, p. 334-341, jun. 2013.

BAIO, F. H. R.; GABRIEL, R. R. F.; CAMOLESE, H. S. Alteração das propriedades físico-químicas na aplicação contendo adjuvantes/changing the physical and chemical properties in the application containing adjuvants. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 9, n. 2, p. 151-161, 2015.

BARROS, Francisco Fábio Cavalcante; QUADROS, Cedenir Pereira de; PASTORE, Gláucia Maria. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 979-985, Dec. 2008.

BANAT, IBRAHIM M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource technology**, v. 51, n. 1, p. 1- 12, 1995.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BEZERRA, Humberto. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica***. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de -, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, Alexandre Paula et al. Composição química e digestibilidade da vagem de algarobeira (*Prosopis juliflora*, Sw) DC) submetida a diferentes tratamentos térmicos. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 257-263, 2009.

BORGES, I. F. **Obtenção e caracterização do melado de algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua utilização em uma formulação alimentícia**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba - UFPB. João Pessoa, 2004.

BUGAY, Cryshelen. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização**. 82 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CASTIGLIONI, Gabriel Luis; BERTOLIN, Telma Elita; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

CAVALCANTE, Adriana. **Avaliação da ecotoxicidade do resveratrol no estágio embriolarval de peixes da espécie *Danio rerio***. 110 f. Tese (Doutorado) -Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2017.

CIAPINA, Elisa Mara Prioli. **Produção de biossurfactante por *rhodococcus erythropolis* em biorreator de bancada e avaliação do seu efeito na biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo** 2008. 139 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

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

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DIAS, César Henrique Araújo. **Estudo da estabilidade emulsificante do biossurfactante produzido a partir da linhagem *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) utilizando o extrato aquoso da algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw) DC] como substrato**. 2019. 59 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.

DIAS, E. C. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa utilizando extratoaquoso da algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw) DC] como substrato**. 2017. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Biotecnologia, João Pessoa/PB.

EDWARDS, Katherine R; LEPO, Joe Eugene; A LEWIS, Michael. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, [S.L.], v. 46, n. 10, p. 1309-1316, out. 2003.

FARIA, Andréia Fonseca de. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual**.173 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FELIPE, Lorena de Oliveira. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química e Sociedade**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 228-236, ago. 2017.

FENG, Jun-Qiao; GANG, Hong-Ze; LI, Dong-Sheng; LIU, Jin-Feng; YANG, Shi-Zhong; MU, Bo-Zhong. Characterization of biosurfactant lipopeptide and its performance evaluation for oil-spill remediation. **Rsc Advances**, [S.L.], v. 9, n. 17, p. 9629-9632, 2019.

FERRARI, Fernanda Cristina dos Santos. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 2013. 74 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

FERREIRA, Roberta Miranda. **Modelagem e simulação de biorreatores tipo torre operando com leveduras auto-imobilizáveis para produção de etanol**. 2003. 172 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GOMES, Maria das Dores Pereira. **Influência dos resíduos agroindustriais (milhocina e farinha de banana verde) na produção de carboidratos totais, quitosana e lipídios por *Cunninghamella echinulata* ucp 1297**. 2013. 78 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

GUDIÑA, Eduardo J.; FERNANDES, Elisabete C.; RODRIGUES, Ana I.; TEIXEIRA, Jose A.; RODRIGUES, Lãgia R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers In Microbiology**, v. 6, p. 59, 6 fev. 2015.

HUDAK, A. J.; CASSIDY, D. P. Stimulating In-Soil Rhamnolipid Production in a Bioslurry Reactor by Limiting Nitrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, December 30, p.861-868, 2004.

KANGA, S.H.; BONNER, J.S.; PAGE, C.A.; MILLS, M.A.; AUTENRIETH, R.L. Solubilization of naphthalene and methyl-substituted naphthalene from crude oil using biosurfactants. **Environment Science Technology**, 31: 556-561, 1997.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p.1731-1737, 1992.

LAWRENCE, Christian. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. **Aquaculture**, [S.L.], v. 269, n. 1-4, p. 1-20, set. 2007.

LIMA, Jaceline Maria de Negreiros. **Produção do complexo quitosana-polifosfato em *Rhizopus oryzae* UCP 1506 utilizando substratos agroindustriais**. 2011. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.

LIVINSKI, C.T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

MAKKAR. R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects os various nutritional suplementes on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45 °C. **Journal of Surfactants and Detergents**, Germany, v. 5, p.11-17, 2002.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 1, p. 1–19, 2011.

MARQUES, Renata Cristina Duarte. **Estudo físico-químico, microbiológico e tecnológico de resíduos da industrialização de milho e aproveitamento alimentar a partir da elaboração de massas alimentícias**. 2016. 236 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016

MARTINS, Rafael Xavier. **Soro de leite bovino como produto inovador para alimentação dos estágios iniciais da vida do peixe-zebra (*Danio rerio*)**. 2017. 62 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAES, Diane Téó de. **Produção do lipopeptídeo surfactina a partir de uma cepa de *Bacillus subtilis* com o operon *srfa* sob controle do promotor regulado *pgrac***. 2010. 102 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010

MORAIS, Renara Kariny Santos de. **PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO**. 2012. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012

MULLIGNA, N. C.; GIBBS, F. B. Biosurfactants: Production, Properties and Applications, capítulo Factors Influencing the Economics of Biosurfactants. **Marcel Dekker**, New York, USA, p. 329-368, 1993.

NAKAMA, Y. Surfactants. In: SAKAMOTO, Kazutami. **View on ScienceDirect Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**. Amsterdã: Elsevier, p. 231-234, 2017.

Nelania, M. de Q. B., Evelyne, G. S., Flavia, V. F. de A., Erik, J. V. de M., Jose, R. N. C. F., Maira, J. de A. C. Norma, B. de G. Effects of gamma radiation on enzymatic production of lignolytic complex by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, 14(7), 612–621. 2015

NEVES, L. C. M., OLIVEIRA, K. S., KOBAYASHI, M. J., PENNA, T. C. V., CONVERTI, A. Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 7, 136-140, 539-554, 2007.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p. 81-85, 2004.

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

NITSCHKE, M., PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

OECD. Test No. 236: fish embryo acute toxicity (fet) test. **Oecd Guidelines For The Testing Of Chemicals, Section 2**, [S.L.], 26 jul. 2013

PAES, Maria Cristina Dias. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

PEGADO, C. M. A.; ANDRADE, L. D.; FÉLIX, L. P.; PEREIRA, I. M. Efeitos da invasão

biológica de algaroba - *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. sobre a composição e a estrutura do estrato arbustivo-arbóreo da caatinga no Município de Monteiro, PB, Brasil. **Acta Botanica Brasilis**, v. 20, n. 4, p. 887-898, 2006

PEREIRA, J. Dispositivo de baixo custo para acasalamento de peixe-zebra (*Danio rerio*) Científica e Tecnológica PIBIC/ PIBITI/ PIBIC-AF/ PIVIC/ PIVITI) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017

PHAN, T. T. O., NGUYEN, H. D., SCHUMANN, W. Novel plasmid based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Protein expression and purification**, v. 46, p.189-195, 2006

PINTO, Marta Heidtmann; MARTINS, Roberta Guimarães; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009

ROCHA, M. V. P., BARRETO, R. V. G., MELO, V. M. M., GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 155, p366-378, 2009.

SAMPAIO, R. M. **Estudo da produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação em óleo-diesel comercial**. 1995. Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas

SANTOS, Danyelle Khadydja F. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **Int. J. Mol. Sci**, Recife, v. 17, p. 401-402, mar. 2016.

SANTOS, Elane Cristina Lourenço dos et al . Biosurfactant Production by *Bacillus* strains isolated from sugar cane mill wastewaters. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 62, 2019.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinas por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 148p. 2007

SANTOS, Vanessa Santana Vieira; SILVEIRA, Edgar; PEREIRA, Boscilli Barbosa. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. **Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part B**, [S.L.], v. 21, n. 6-8, p. 382-399, 17 nov. 2018.

SARI, C N; HERTADI, R; GOZAN, M; ROSLAN, A M. Factors Affecting the Production of Biosurfactants and their Applications in Enhanced Oil Recovery (EOR). A Review. **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S.L.], v. 353, 31 out. 2019

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Blücher, 2001, vol. 2

SHARMA, R.. Fruit and Vegetable Processing Waste: Renewable Feed Stocks for Enzyme Production. In: DHILLON, Gurpreet Singh. **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. Edmonton: Academic Press, p. 23-59. 2016

SILVA, Celiane Gomes Maia da et al . Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 27, n. 4, p. 733-736, Dec. 2007

SILVA, Celiane Gomes Maia da et al. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 733-736, Dec. 2007.

SILVA, Suely Alves da et al. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Quím. Nova**, São Paulo, v.24, n. 4, p. 460-464, Aug. 2001

SILVA, Arauana Lima. **Utilização de linhagem bacteriana isolada de solo de canavial para produção de biossurfactantes**. 2017. 62 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017

SILVEIRA, Themis Reverbel da; SCHNEIDER, Ana Claudia; HAMMES, Thais Ortiz. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 4-5, jun. 2012

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: PArt2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SLIVINSKI, C.T. **Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

SOBRINHO, H. B. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica***.. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, 2007

SOUSA, M. **Bioconversão do glicerol para produção de biossurfactantes: aplicação no preparo de emulsões**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011

SPENCE, Rowena; GERLACH, Gabriele; LAWRENCE, Christian; SMITH, Carl. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, [S.L.], v. 83, n. 1, p. 13-34, 17 dez. 2007.

STEIN, R. B. S.; TOLEDO, L. R. A.; ALMEIDA, F. Q.; COSTA, V. T. M. Uso do farelo devagem de algaroba (*Prosopis juliflora*, Swartz) D.C.) em dietas para equinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1240-1247, 2005

VERA, Ellen Cristina Souza. **Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas propriedades**. 2017. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Res. J. Microbiol.**, v. 10, p. 181–192, 2015.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 1, p. 44–49, 1997.

WANG, Ruhung; MEREDITH, Alicea N.; LEE, Michael; DEUTSCH, Dakota; MIADZVEDSKAYA, Lizaveta; BRAUN, Elizabeth; PANTANO, Paul; HARPER, Stacey; DRAPER, Rockford. Toxicity assessment and bioaccumulation in zebrafish embryos exposed to carbon nanotubes suspended in Pluronic® F-108. *Nanotoxicology*, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 689-698, 11 nov. 2015.

YAMASHITA, Akihito. Improvement of the evaluation method for teratogenicity using zebrafish embryos. *J Toxicol Sci* ., v. 39, n. 3, p. 453-464, jun. 2014.

YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGER, K.N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, v. 56, p. 339-346, 2004.

GLOSSÁRIO

Ágar: Polissacarídeo complexo derivado de uma alga marinha e usado como agente solidificante em meios de cultura.

Autoclave: Equipamento para esterilização por vapor sob pressão, normalmente operado a 15 psi e 121°C.

Bactéria gram-negativa: bactéria que perde a cor do cristal violeta após descoloração por álcool; ela se cora de vermelho após tratamento com safranina.

Biorreator: recipiente para fermentação no qual as condições ambientais são controladas, como temperatura e pH.

Biorremediação: uso de micróbios para remover um poluente ambiental.

Espectrofotômetro é um aparelho amplamente utilizado em laboratórios, cuja função é a de medir e comparar a quantidade de luz (energia radiante) absorvida por uma determinada solução.

Fase log: período de crescimento bacteriano ou aumento exponencial do número de células; também chamada de fase exponencial.

Fenótipo: Manifestação externa do genótipo ou constituição genética de um organismo.

Grupo funcional: arranjo de átomos em uma molécula orgânica, o qual é responsável pela maioria das propriedades químicas da molécula.

Íon: átomo ou grupo de átomos positiva ou negativamente carregados.

Metabólito produto de uma população celular industrial gerado durante período de rápido crescimento logarítmico

Micela :uma estrutura globular formada por um agregado de moléculas anfipáticas, ou seja, compostos que possuem características polares e apolares simultaneamente, dispersos em um líquido constituindo uma das fases de um coloidenismo.

Patogenicidade: habilidade de um micro-organismo de causar doença sobrepujando as defesas do organismo.

Redução: adição de elétrons a uma molécula.



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Certificamos que a proposta intitulada "Uso de embriões de zebrafish (Danio rerio) como sistema-modelo para avaliação de risco e toxicidade de novas tecnologias e contaminantes ambientais", protocolada sob o CEUA nº 4460140920 (ID 001231), sob a responsabilidade de **Davi Felipe Farias e equipe; Juliana Alves da Costa Ribeiro; Leonardo Rogério Vieira; Rafael Xavier Martins** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 13/11/2020.

We certify that the proposal "Use of zebrafish (Danio rerio) embryos as model system for risk assessment and toxicity of novel technologies and environmental contaminants", utilizing 5440 Fishes (males and females), protocol number CEUA 4460140920 (ID 001231), under the responsibility of **Davi Felipe Farias and team; Juliana Alves da Costa Ribeiro; Leonardo Rogério Vieira; Rafael Xavier Martins** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 11/13/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 11/2020 a 10/2023

Área: Ciências Biológicas

Origem: Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais (UniPOM)

Espécie: Peixes

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 1 a 3 horas

N: 5440

Linhagem: Danio rerio

Peso: 0 a 0 g

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados na sala de experimentação da Unidade de Produção de Organismos Modelo Não Convencionais, Depto. de Biologia Molecular, Campus I, UFPB.

João Pessoa, 13 de novembro de 2020

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino

Alanis Clemente Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade Federal da Paraíba
Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto

Vice-Coordenador da

Universidade Federal da