

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos

Produção Biotecnológica de Surfatante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações

Aluna: Giselle Aparecida Nobre Costa

Orientadora: Gláucia Maria Pastore

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Ciências de alimentos.

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Giselle Aparecida Nobre Costa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de fevereiro de 2005.

Campinas, 28 de fevereiro de 2005.


Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

~~Presidente da Banca~~

Campinas, 2005

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	52
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	0823p
V	EX
TOMBO BC/	63040
PROC.	16.86.05
C	☐
D	☒
PREÇO	11.00
DATA	02.4.05
Nº CPD	

BIBID-345733

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Costa, Giselle Aparecida Nobre
At17m
C823p
Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em
resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações / Giselle
Aparecida Nobre Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biosurfactantes. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Tensão
superficial. 4. Agentes antibacterianos. I. Pastore, Gláucia
Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biosurfactants, *Bacillus subtilis*, Surface tension,
Antimicrobial agents

Área de concentração: Bioquímica de alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Gabriela Alves de Macedo

Márcia Nitschke

Marta Cristina Teixeira Duarte

Data de defesa: 24/02/2005

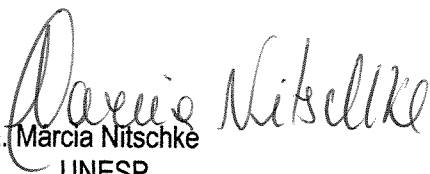
BANCA EXAMINADORA

Dissertação de mestrado aprovada e defendida em de de 2005, pela banca
examinadora constituída por:

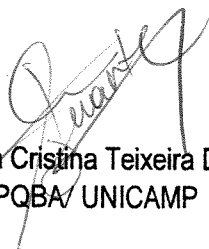


Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Prof. Dra. Gabriela Alves de Macedo
DCA/FEA/UNICAMP



Dra. Marcia Nitschke
UNESP



Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
CPQBA/ UNICAMP



**"O segredo é não correr atrás das
borboletas...**

**É cuidar do jardim para que elas
venham até você..."**

MÁRIO QUINTANA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela grandiosidade de estar vivo e desfrutando de todas as possibilidades que a vida nos dá....

À mamãe, por seu amor sem fronteiras e por ser sinônimo de generosidade e caráter e portanto, o meu exemplo querido de vida;

Ao meu pai, por se a "engrenagem" dos meus sonhos de SER GRANDE; o seu desejo de nos "diplomar" como dizia, foi mais além... e estamos felizes, não?

Aos meus irmãos: Gaby, Lú, Grayce, Juca e Fred pelo carinho e incentivo constante;

Ao Fernando por ser a razão maior de tudo o que sou, o seu apoio incondicional me dá a certeza de que nossos dias juntos são muito mais que...Ô! happy day....

À Profa. Gláucia, pela confiança e por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisas;

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões valiosas, sobretudo à Nitschke pelo exemplo de ética e dedicação na conduta do seu e deste trabalho, seu empenho e disponibilidade para comigo são indicativos da excelente orientadora que você certamente será;

Aos pesquisadores Marta e João Ernesto (CPQBA), pela colaboração;

À Profa. Hélia pelo coração enorme e pelo exemplo de dedicação;

À Plaza S/A pela doação da manipueira;

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPQ) pela concessão da bolsa;

Ao pessoal dos laboratórios de bioquímica e bioaromas e aos técnicos Gui, Bia e Dora;

À secretaria de pós -graduação e às bibliotecárias pela atenção e boa vontade a mim demonstrados;

Aos amigos: Haroldo, Fê, às Lulús (Fleuri, Ferracini e Bittar), Vânia, Dedê, Luis, Danizinha, Dani Sadia, Rô, CD e Júlio por estenderem a nossa amizade para além do ambiente de trabalho. Fica uma saudade boa

das nossas constantes discussões na cozinha e mesa de estudos do laboratório (BQ); eu acredito que ali nascem grandes idéias e bons pesquisadores...

Às minha queridas amigas do Ital onde tudo começou... Fá, Van, Eliane, Vanessa, Thelma, Fê, Chaveirinho e Jú, por tornarem os nossos (Eu e Nando) dias em Campinas muito mais gostosos, vocês estarão sempre comigo;

Às famílias Gonçalves e Góí que se tornaram um pouco nossas... Obrigado pelo carinho;

Às amigas Margô, Araceli e Luluzinha juntamente com os maridos por nos permitir contar com vocês sempre....

Harry, por tudo que tem feito por mim desde que "virei baiana"; eu só posso agradecê-lo muito e dizer que pode sempre contar comigo;

A Lourdes, Madson e Maria Eugênia por nos receber tão bem em SSA.;

e finalmente e não menos importante, à família do Nando que também é minha a muito tempo, obrigado pelo apoio e por nos mostrar como viver intensamente....

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Propriedades e funções dos biossurfatantes	10
3.1.1 Propriedades	10
3.1.2 Função Fisiológica	13
3.2 Biossíntese de surfatantes e genética de microrganismos	14
3.2.1 Biossíntese	14
3.2.2 Genética	17
3.3 "Screening" para obtenção de biossurfatantes:	18
3.3.1 Métodos De Detecção	18
3.3.2 Seleção Do Microrganismo	20
3.4 Produção e recuperação de biossurfatantes	21
3.4.1 Produção	21
3.4.1.1 Fatores que afetam a produção de biossurfatantes	21
3.4.1.2 Meio de cultivo	24
3.4.2 Extração	26
3.5 Aplicações	28
3.5.1 Aplicações Favoráveis Ao Meio Ambiente:	29
3.5.2 Aplicações industriais	31
3.6 Utilização de substratos alternativos para produção de surfatantes	35
3.6.1 Manipueira	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Definição e caracterização do meio de cultivo	41
4.1.1 Manipueira	41
4.1.2 Composição do substrato	41
4.2 Microrganismo	42
4.2.1 Manutenção da cultura e inóculo	42
4.2.2 Contagem de células viáveis	42
4.2.3 Densidade óptica	43

4.2.4 Microscopia de varredura	43
4.3.1 Determinação da tensão superficial (TS)	44
4.3.2 Determinação da diluição micelar crítica (CMD).....	44
4.3.3 Determinação da tensão interfacial (TI).....	45
4.3.4 Concentração micelar crítica (CMC).....	45
4.3.5 Concentração do biossurfatante bruto.....	45
4.4 Produção de Biossurfatante	46
4.5 Extração e purificação do composto.....	46
4.5.1 Extração	46
4.5.2 Purificação em cromatografia de adsorção	46
4.5.3 Cromatografia de adsorção em sephadex LH20	47
4.6 Caracterização	47
4.6.1 Conteúdo protéico e lipídico	47
4.6.2 Análise de aminoácidos.....	48
4.6.3 Espectrometria de massa – esi	48
4.6.4 Estudos de estabilidade	48
4.6.4.1 Estabilidade a pH	48
4.6.4.2 Estabilidade a temperatura	48
4.6.4.3 Estabilidade frente à força iônica	49
4.6.4.4 Estabilidade à ação enzimática	49
4.7 Aplicações do biossurfatante.....	49
4.7.1 Atividade emulsificante (e_{24} , e_{72}):.....	49
4.7.2 Potencial para biorremediação.....	50
4.7.3 Atividade antimicrobiana	50
4.7.3.1 Método de difusão em ágar	50
4.7.3.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC)	51
4.7.4 Atividade antitumoral	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1 Caracterização do substrato manipulada	53
5.1.1. Manipulada F	53
5.1.2 Composição química.....	53
5.2 Microrganismo.....	56
5.3 Cinética de Produção	57
5.4 Caracterização do biossurfatante	64
5.4.1 Estabilidade a pH, temperatura, força iônica e ação enzimática.....	64

5.4.2 Caracterização química	68
5.5 Aplicações	72
5.5.1 Capacidade emulsificante	72
5.5.2 Biossurfatante de <i>b. subtilis</i> lb5a em biorremediação	76
5.5.3 Atividade antibiótica.....	79
5.5.4 Atividade anticancerígena	81
6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	85

INDICE DE TABELAS

Tabela 1- Principais classes de biossurfatantes, microrganismos envolvidos e atividade superficial.....	9
Tabela 2- Índice de balanço hidrofílico / lipofílico e características da emulsão formada.....	11
Tabela 3- Principais aplicações comerciais dos biossurfatantes	35
Tabela 4- Caracterização química da manipueira F.....	54
Tabela 5 - Ação das enzimas ficina, bromelina, papaína e tripsina e diferentes concentrações sobre a atividade superficial do biossurfatante de <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.....	67
Tabela 6 - Principais homólogos do biossurfatante surfactina, obtido de <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira, analisados por espectrometria de massas.....	72
Tabela 7 - Óleos e porcentagens de composição dos ácidos graxos principais	74
Tabela 8 - Microrganismos envolvidos no teste de inibição quantitativo da concentração inibitória mínima (MIC)	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ramnolípídeo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , duas subunidades de ramnose ligadas a dois ácidos β - hidroxidecanóico.....	6
Figura 2 - Estrutura de surfactina de <i>B. subtilis</i> , um heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácido graxo de tamanho variado.....	7
Figura 3 - Estrutura do Emulsan de <i>A. calcoaceticus</i>	7
Figura 4 - Fosfatidiletanolamina de <i>Acinetobacter</i> sp. R ₁ e R ₂ são cadeias de hidrocarbonetos.....	8
Figura 5 - Ácido corinomicólico de <i>Corynebacterium</i> sp., R ₁ , R ₂ = grupamentos alquil.....	9
Figura 6 - Fotografia em microscópio de varredura do microrganismo LB5a em diferentes condições. A) Cultivo em ágar nutriente (A. Nu) 30°C/24 h; B) Cultivo em caldo nutriente 30°C/8 h a 150 rpm; C) Cultivo em meio manipueira F 30°C / 8 horas 150 rpm , 1vvm ar/L meio e D) Cultivo em manipueira F 36 horas mesma condição.	57
Figura 7 - Fermentador de bancada em funcionamento. A seta destaca a espuma coletada em Kitassato, indicativo de produção de tensoativos pelo Bacilo LB5a.....	60
Figura 8 - Espectro de massa (EM) da surfactina padrão, os diferentes sinais de m/z, são diferenciados pela presença de (A) surfactina + próton, (B) surfactina + sódio e C) surfactina + potássio.	71
Figura 9 - Espectro de massa (EM) da amostra de surfactina, os diferentes sinais de m/z, são diferenciados pela presença de (A) surfactina + próton, (B) surfactina + sódio e C) surfactina + potássio.	71
Figura 10 - Emulsões (E ₇₂) de solução (1mg/mL) de biossurfatante de <i>B. subtilis</i> LB5a frente a diferentes óleos: (da esquerda para direita)cupuaçu, linhaça, soja, canola, buriti, andiroba, palma, girassol, oliva, babaçu, maracujá e castanha do Pará.....	74
Figura 11 - Emulsões (E ₇₂) de solução (1mg/mL) de biossurfatante de <i>B. subtilis</i> LB5a frente a diferentes hidrocarbonetos e combustíveis: (da esquerda para direita)benzeno, tolueno, octadecano, tetradecano, decano, hexadecano, ciclohexano, óleo de motor, gasolina, diesel.	75
Figura 12 - Placas contendo o material utilizado no teste de biorremediação, A) Areia lavada com surfactina de <i>B. subtilis</i> LB5a, B) Areia lavada com água, Controle 1) areia impregnada com petróleo e controle 2) areia limpa.....	77
Figura 13 - Material utilizado no teste de biorremediação: A) Areia lavada com solução de surfactina de <i>B. subtilis</i> LB5a, Erlenmeyer utilizado para agitação e água de lavagens após 12 (A ₁)e 24 (A ₂)horas; B) Areia lavada com água, Erlenmeyer utilizado para agitação e água de lavagens após 12 (B ₁) e 24 (B ₂) hs.....	77
Figura 14 - Quebra da emulsão formada no teste de biorremediação, por efeito da adição de 0,5% (p/p) de CaCl ₂	78

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cinética de produção de biossurfatante pelo <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira utilizando fermentador de bancada.....	59
Gráfico 2 - Cinética de produção de biossurfatante pelo <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira utilizando fermentador de bancada	62
Gráfico 3 - Consumo de carboidratos pelo <i>B. subtilis</i> LB5a durante o cultivo em fermentador de bancada.....	62
Gráfico 4 - Determinação da CMC através de diluições sucessivas de uma solução 1 mg/mL de biossurfatante bruto.....	63
Gráfico 5 - Efeito da temperatura (135°C) sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.....	65
Gráfico 6 - Efeito da ação do pH sobre a atividade superficial do surfatante produzido pelo <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.....	65
Gráfico 7- Efeito da ação de diferentes concentrações salinas sobre a atividade superficial do surfatante produzido pelo <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.....	66
Gráfico 8 - Índice de emulsificação obtido para diferentes óleos utilizando uma solução (1mg/mL) do biossurfatante de <i>B. subtilis</i> LB5a em meio manipueira.....	75
Gráfico 9 - Índice de emulsificação obtido para diferentes hidrocarbonetos e combustíveis, utilizando uma solução (1mg/mL) do biossurfatante de <i>B. subtilis</i> LB5a em meio manipueira.....	76
Gráfico 10 - Porcentagem de crescimento de células de câncer humano [ovário (OVCAR), renal (786-6), próstata (PC03), cólon (HT29), pulmão (NCI460), mama (MCF-7), mama resistente (NCIADR) e melanoma (UACC-62)] após 48 h na presença de diferentes concentrações da surfactina. Os valores positivos em relação ao eixo y correspondem à atividade citostática enquanto os valores negativos à atividade citotóxica da surfactina. Os dados obtidos são referentes a um experimento representativo e amostras em triplicata.....	82

RESUMO

Biossurfatantes são compostos anfipáticos de origem biológica que apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Esta propriedade lhes confere a capacidade de diminuir a tensão superficial e interfacial de um meio líquido.

Na busca de fontes alternativas para a produção de compostos de interesse biotecnológico, o uso de subprodutos de processamento agrícola ou industrial apresenta um vasto campo a ser explorado. A industrialização da mandioca, em farinha e fécula, gera aproximadamente 240.000 L de resíduo/mês. Este resíduo, a manipueira, é altamente tóxico (devido à presença de glicosídeos cianogênicos) e poluente (dado a altas concentrações de matéria orgânica não esgotada que podem atingir 100 g DQO/L).

A possibilidade da utilização deste resíduo como substrato para microrganismos e o interesse na produção de compostos biotecnologicamente relevantes nos incentivou a investigar a produção de biossurfatantes pela cepa *Bacillus subtilis* LB5a.

Definidas as condições e cinética da fermentação, foi obtido uma produção de 2,5 g/L de surfatante em 36 horas de cultivo. O tensoativo se mostrou capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 47,74 mN/m, para 25,96 mN/m, CMD-¹ de 26,19 e CMD-² de 29,47 mN/m, com tensão interfacial contra hexadecano de 0,76 mN/m, além de CMC de 10 mg/L. O extrato apresentou estabilidade a altas concentrações de sal (>15%), elevadas temperaturas (135°C), ampla faixa de pH (6-12) e foi estável a variadas concentrações de enzimas do tipo cisteína-proteases.

A análise de aminoácidos do produto purificado, revelou a presença de ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina na proporção 1:1:1:4, caracterizando o produto como um lipopeptídeo. Por espectrometria de massas foi confirmada a presença de uma série homóloga de lipopeptídeos com variações no tamanho da cadeia hidrocarbônica caracterizando o composto como o tensoativo surfactina. Além disso, verificou-se a predominância do homólogo de massa molecular 1036 g/Mol.

O biossurfatante de *B.subtilis* LB5a, apresentou capacidade de formar emulsões estáveis em óleos, hidrocarbonetos e combustíveis; revelou-se como substância potencial para utilização na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) e em biorremediação, avaliado a partir da remoção de óleo bruto de areias contaminadas. Além disso, apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e negativas e apresentou ação antiproliferativa sobre células tumorais humanas.

Os resultados descritos neste trabalho fornecem dados relevantes acerca do potencial do biossurfatante surfactina e suas possíveis aplicações. Além disso, evidenciam a manipueira como um excelente substrato para a produção de biossurfatante pela cepa estudada, possibilitando uma grande redução de custos de produção através da utilização de um resíduo como substrato, bem como pelo processo de obtenção do produto por métodos bastante simplificados.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic compounds from biological source showing both hydrophilic and lipophilic groups. Due to this feature, the biosurfactants acts decreasing the surface and interfacial tension of a liquid. The byproducts of agrícola and industrial processing are an underexplored new sources to the production of biotechnological interesting compounds. The cassava industrialization yields c.a. 240.000L of residue by month. This residue, cassava wastewater (manipueira), is highly toxic (due to the presence of cyanogenic glycosides) and poluent (due to high concentrations of organic matter, that may reach 100 gDQO/L).

The possibility of the utilization of manipueira as substract for microorganism growth and the interest in the production of biotecnologically important aducts, encourage us to investigate the biosurfactants production by *Bacillus subtilis* LB5a strain.

After the growing conditions optimizations, 2,5 g/L of surfactant was obtained in 36 hours. The biosurfactant have reduced the surface tension of the medium from 47,74 mN/m to 25,96 mN/m, CMD⁻¹ of 26,19 and CMD⁻² of 29,47 mN/m, with interfacial tension against hexadecane of 0,76 mN/m and CMC of 10 mg.L⁻¹.

The extract show stability with respect to high salt concentration, high temperature, wide range of pH (6-12) and to several concentrations of diferent cysteine proteases.

The aminoacids analysis of purified product, revealed the presence of glutamic acid, aspartic acid, valine and leucine at a 1:1:1:4 ratio, characterizing the product as a lipopeptide. Mass spectrometry analysis confirmed the presence of a lipopeptide homologous serie with variations in the hydrocarbon chain lenght, known as surfactin. Furthermore, was verified the predominance of the 1036 g.Mol⁻¹ molecular mass homologous.

The biosurfactant from LB5a strain was able to produce stable emulsions in oils, hydrocarbons and fuels, bioremediation and Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR), potential were observed by the remotion of crude oil from contaminated sand. The surfactin also showed antibacterial activity agains gram positive and negative bacterias and showed antiproliferative activity agains human tumoral cells.

The results described herein give important data reflecting the surfactant potential of the surfactin and its applications. Moreover, they reveal the manipueira as an excellent substrate to the biosurfactant production by the studied strain. The utilization of an industrial residue as substrate allows a strong cost reduction to the sufactant production and consists a potentially alternative to the treatment of this effluent.

1. INTRODUÇÃO

O estudo e desenvolvimento de compostos químicos sintéticos e biológicos têm recebido atenção especial, sobretudo aqueles cujas propriedades apresentam possibilidades de aplicações que coadunem com a melhoria da qualidade de vida de um modo geral.

Os biossurfatantes, compostos oriundos de microrganismos ou plantas compreendem substâncias de interesse relevante, de natureza biodegradável, baixa toxicidade e devido às propriedades químicas apresentam ampla diversidade de emprego.

Biossurfatantes são moléculas de natureza anfipática, que possuem em sua estrutura, uma porção hidrofóbica (apolar) geralmente composta por hidrocarbonetos e um sítio hidrofílico (polar) composto por grupamentos carboxílicos ou aminoácidos.

Devido a classificação como produtos "ecologicamente corretos", o desenvolvimento e a utilização de surfatantes obtidos biologicamente vêm gradativamente ganhando espaço, porém seu uso não é bem difundido industrialmente, devido aos seus altos custos de produção, em detrimento dos surfatantes sintéticos. Contudo, o custo da produção de biossurfatantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis.

Uma possível alternativa para a produção destes compostos seria o uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. O aproveitamento de resíduos contribui para a redução da poluição ambiental, reduz o custo de produção destas biomoléculas, além de valorizar economicamente os resíduos que seriam simplesmente descartados.

Neste contexto, a busca de fontes alternativas para a produção de compostos de interesse biotecnológico, a manipueira (água de mandioca), um resíduo líquido, altamente tóxico gerado pelas indústrias processadoras de farinha e fécula, com alto conteúdo de carboidratos e minerais, apresenta-se

como subproduto potencial para ser utilizado como substrato por microrganismos na produção destas substâncias.

Algumas espécies de microrganismos são conhecidas pela sua capacidade de produzir compostos com propriedades tensoativas, dentre estes, destaca-se a surfactina de *Bacillus subtilis*, considerada como um dos biossurfatantes conhecidos mais potentes.

A despeito dos altos custos envolvidos na produção de biossurfatantes, como resposta à crescente demanda por fontes alternativas de substâncias mais baratas e menos agressivas ao meio ambiente e, sobretudo de proeminente interesse biotecnológico; este projeto tem por objetivo dar sequência a estudos anteriores já realizados no Laboratório de Bioquímica de Alimentos e sobretudo, viabilizar a produção de surfatante por *Bacillus subtilis* em fermentador de bancada; estudar sua recuperação, caracterização e aplicações de interesse relevante.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- ✓ Investigar a produção de biossurfatante de *Bacillus subtilis* LB5a em fermentador de bancada, utilizando a manipueira como substrato,
- ✓ Otimizar o processo de obtenção do produto,
- ✓ Purificar e caracterizar o biossurfatante obtido,
- ✓ Avaliar aplicações de interesse biotecnológico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Os surfatantes, devido a sua natureza anfipática, se distribuem nas interfaces (líquido/líquido ou gás/líquido) com diferentes graus de polaridade, alterando as características entre fases. A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, caracterizando uma propriedade particular dos surfatantes¹. Tal característica torna estes compostos adequados para várias aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases².

A porção hidrofílica destas moléculas compreende formas aniônicas ou neutras, constituídas de mono, di- ou polissacarídeos, ácidos carboxílicos, aminoácidos ou peptídeos. Já o fragmento lipofílico é usualmente um ácido graxo saturado, insaturado ou hidroxilado².

Existem duas classes principais de surfatantes: os sintéticos e os produzidos biologicamente, biossurfatantes³. Estes últimos têm como origem plantas (saponinas), microrganismos (glicolipídeos) e animais superiores como o organismo humano (sais biliares). Conforme a natureza, são utilizados para atividades intra e extracelulares como a emulsificação de nutrientes, transporte de materiais através das membranas celulares e no reconhecimento celular⁴.

Os biossurfatantes microbianos, compostos que exibem atividades superficial e emulsificante, particularmente altas, formam um grupo diverso, sintetizados principalmente a partir de hidrocarbonetos por microrganismos:

¹ LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 66: 109 -120, **1996**.

² DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1): 47- 64, **1997**.

³ HOROWITZ, S. ; GILBERT, J.N. ; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Microbiology*, 6: 243 - 248, **1990**.

⁴ BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152: 41-52, **1999**.

Na última década, com a crescente preocupação relacionada à preservação ambiental, com o aumento da demanda por produtos "ecologicamente corretos", aliados a legislações ambientais mais rigorosas, esta classe de compostos tem adquirido especial atenção de pesquisadores em todo o mundo⁵. A baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade a condições extremas, conferem aos biossurfatantes, vantagens especiais sobre os surfatantes químicos sintéticos⁶.

Biossurfatantes de origem microbiana incluem uma ampla variedade de estruturas químicas, como os glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos proteína-polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros além dos biossurfatantes particulados⁷. Desta forma, desempenham propriedades e funções fisiológicas diversas.

Os biossurfatantes são classificados em seis classes principais^{8, 2}:

1 - Glicolipídeos: São a classe de biossurfatantes mais amplamente conhecida, geralmente formados por um ácido graxo de cadeia longa ligado a um carboidrato via ligação glicosídica, o carboidrato envolvido inclui a glicose, manose, galactose, ácido galacturônico ou ramnose⁹. Estas moléculas se encontram envolvidos na captação de hidrocarbonetos de baixo peso molecular por microrganismos⁴. Dentre os glicolipídeos mais importantes estão os ramnolipídeos (Figura1), trealolipídeos e soforolipídeos.

⁵ CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 520 - 529, 1998.

⁶ DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *C. R. Chimie*, 7:641- 646, 2004.

⁷ GEORGIU, G., LIN, S. C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/Technology*, 10:60 - 65, 1992.

⁸ DESAI, J.D.; DESAI, A. J. Production of biosurfactants. In: *Biosurfactants: production, properties, applications*. In: KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York,. 65 - 97, 1993.

⁹ HOLMBERG, K.; Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: 148 - 159, 2001.

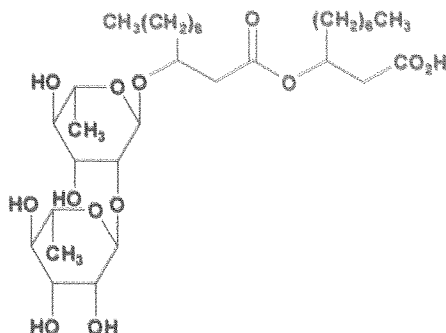


Figura 1- Ramnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa*, duas subunidades de ramnose ligadas a dois ácidos β - hidroxidecanóico.

2 - Lipopeptídeos ou acil-peptídeos: Normalmente são compostos cíclicos resultantes da condensação entre um ácido graxo e um oligopeptídeo. A atividade antibiótica, de gramicidinas e polimixinas, produzidos por *Bacillus brevis* e *B. polymyxa* e de surfactina de *B. subtilis*¹⁰, são exemplos de compostos desta classe.

O surfatante serratomolide de *Serratia marcescens* NS38 aumenta a hidrofobicidade da célula, bloqueando os sítios hidrofílicos na superfície celular¹¹. A surfactina (Figura 2) e a liquenisina¹² produzida por *B. subtilis* e *B. licheniformis*, respectivamente, reduzem a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m, em concentrações muito baixas. Dentre os tensoativos estes são os compostos mais eficientes conhecidos¹³ e são também responsáveis por atividade antibiótica antiviral, antitumoral dentre outras¹⁴.

¹⁰ MARAHIEL, M.; DENDERS, W.; KRAUSE, M.; KLEINKAUF, H. Biological role of gramicidin S in spore function. Studies on gramicidin - S negative mutants of *Bacillus brevis* 9999. European Journal Biochemistry. 99: 49 - 52, 1977.

¹¹ MATSUYAMA, T.; FUGITA, M.; YANO, I. Wetting agent produced by *Serratia marcescens*. FEMS Microbiology Letters, 28: 125 - 129, 1985.

¹² SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimal environmental conditions for the enhanced production of surfactin. Applied Microbiol Biotechnology, 47: 358 - 363, 1997.

¹³ ARIMA, K. ; KAKINUMA, A. ; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochemistry and Biophysics Research Communication, 31: 488 - 494, 1968.

¹⁴ NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Produção e caracterização de biossurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando maníueira como substrato, 2004, 99 p. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, Campinas.

4 - Fosfolipídeos: Estes compostos são formados por cadeias de hidrocarbonetos de ácidos graxos ligadas a um grupo fosfodiéster e são capazes de formar microemulsões e diminuir a tensão superficial entre água e hexadecano, para valores inferiores a 1 mN/m^{17, 2}. Nesta classe destacam-se os biossurfactantes produzidos por *Aspergillus spp.*, *Thiobacillus thiooxidans* e aqueles oriundos de *Arthrobacter* AK-19 e *P. aeruginosa* 44T1 que acumulam 40 e 80 % (p/p) destes lipídeos quando cultivados em hexadecano e óleo de oliva, respectivamente². Em culturas de *Acinetobacter sp.*, a fosfatidiletanolamina (Figura 4) é produzida, formando microemulsões de alcanos em água².

Embora esta classe ocorra em muitos microrganismos, os tensoativos extracelulares são minoria, apresentando destaque para o biossurfactante de *Corynebacterium lepus*, cultivada em hexadecano^{4, 16}.

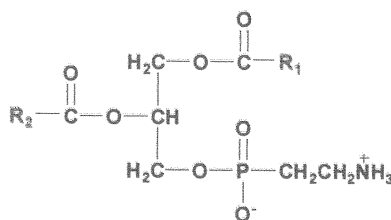


Figura 4- Fosfatidiletanolamina de *Acinetobacter sp.* R₁ e R₂ são cadeias de hidrocarbonetos

5 - Lipídeos Neutros: Compreendem os ácidos graxos, triacilgliceróis e ácidos micólicos¹⁸. A maioria dos lipídeos neutros como os triacilgliceróis e seus ácidos graxos constituintes mostram algum grau de atividade superficial^{19, 20}, assim como os ácidos micólicos que constituem ácidos graxos mais complexos. Estes compostos, por sua vez, são sintetizados por espécies de *Mycobacterium spp.* e por alguns gêneros

¹⁷ CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology, 50: 846 - 850, 1985.

¹⁸ BOULTON, C.A.; RATLEDGE, C.; Biosynthesis of lipid precursors to surfactant production. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. eds. Biosurfactants and biotechnology. Surfactant Science Series. v. 25, Dekker, New York, 47- 87, 1987.

¹⁹ COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E. Surface active compounds from microorganisms. Advances in Applied Microbiology, 26: 229 - 253, 1980.

²⁰ ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W.; Biosurfactant. CRC Critical Review Biotechnology, 1: 87 – 107, 1984.

de *Nocardia*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus*; possuem misturas de ácidos graxos α e β - hidroxilados ligados a longas cadeias hidrocarbônicas. A Figura 5 mostra um exemplo de ácido corinomicólico.

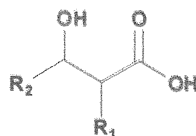


Figura 5- Ácido corinomicólico de *Corynebacterium* sp., R_1 , R_2 = grupamentos alquil

6 - Lipídeos particulados: Espécies de *Cyanobacteria* e alguns patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Serratia* sp., além de bactérias do gênero *Acinetobacter* sp., quando crescem em meio contendo hexadecano produzem vesículas extracelulares que apresentam hidrofobicidade, e, portanto desempenham importante função na captação de alcanos para a célula²¹. As vesículas e células microbianas com atividade tensoativa são consideradas por si só, biossurfatantes particulados.

Um grande número de microrganismos têm se mostrado capaz de produzir compostos com atividade superficial variada, cujas funções ainda não foram totalmente elucidadas. A Tabela 1 mostra as principais classes de biossurfatantes, os organismos envolvidos na sua produção e a tensão superficial com relação à tensão superficial da água (72 mN/m)

Tabela 1- Principais classes de biossurfatantes, microrganismos envolvidos e atividade superficial.

Biossurfatante	Microrganismos	Tensão superficial (mN/m)
Glicolipídeos		
ramnolipídeos	<i>P. aeruginosa</i>	29
	<i>Pseudomonas</i> sp.	25 - 30
trehalolipídeos	<i>Rodhococcus erythropolis</i>	30
	<i>Mycobacterium</i> sp.	38
soforolipídeos	<i>Torulopsis bambicola</i>	33
	<i>T. apicola</i>	30
	<i>T. petrophilum</i>	
celobiolipídeos	<i>U. zeae</i> , <i>U. maydis</i>	

²¹ KAPPELI, O.; FIECHTER, A . Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. Journal of Bacteriology, 131: 917-921, 1977.

Lipopeptídeos e lipoproteínas		
peptídeo - lipídeo	<i>B. licheniformis</i>	27
serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>	28 - 33
viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	26,5
surfactina	<i>B. subtilis</i>	27- 32
gramicidina	<i>B. brevis</i>	
polimixina	<i>B. polymyxa</i>	
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos		
ácidos graxos	<i>C. lepus</i>	30
lipídeos neutros	<i>N. erythropolis</i>	32
fosfolipídeos	<i>T. thiooxidans</i>	
Surfatantes poliméricos		
emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>	
biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>	
liposan	<i>Candida lipolytica</i>	
manana lipídeo-proteína	<i>C. tropicalis</i>	
Carboidrato lipídeo-proteína	<i>P. fluorescens</i>	27
	<i>D. polymorphis</i>	
	<i>P. aeruginosa</i>	
Surfatantes particulados		
vesículas extracelulares	<i>A. calcoaceticus</i>	
células microbianas hidrofóbicas com alta atividade superficial		
Fonte: Desai & Banat (1997) ² e Karanth <i>et. al</i> (1999) ²²		

3.1 Propriedades e funções dos biossurfatantes

3.1.1 Propriedades

A atividade de um biossurfatante pode ser verificada através da avaliação de alterações de tensão superficial e interfacial de um determinado meio, da capacidade de estabilizar ou desestabilizar emulsões e do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL)². A capacidade de reduzir a tensão superficial de um meio para valores abaixo de 30 mN/m e a tensão interfacial contra n - alcanos, para valores inferiores a 1 mN/m é a

²² KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. Current Science, 77(1): 116-126, 1999.

principal propriedade de compostos biossurfatantes⁷. A estabilidade da emulsão formada determina a efetividade do surfatante. Já o sistema BHL prediz empiricamente as propriedades de um surfatante a partir de sua estrutura molecular baseado na porcentagem de peso molecular dos grupamentos hidrofílicos, lipofílicos, ou ambos numa molécula²³. O índice ilustrado na Tabela 2, indica o tipo de emulsão formada conforme o BHL do surfatante.

Tabela 2 - Índice de balanço hidrofílico / lipofílico e características da emulsão formada

Razão BHL	Característica	Tipo emulsão
< 9	lipofílica	A/O
9 - 11	intermediária	A/O e O/A
> 11	hidrofílica	O/A

Com o aumento da concentração de um surfatante em um sistema ar/água ou óleo/água, a tensão superficial diminui gradualmente até a formação de estruturas supramoleculares como micelas, bicamadas e vesículas. Este valor de concentração é conhecido como concentração micelar crítica (CMC). Este parâmetro é comumente usado como medida de eficiência de um surfatante. Sendo que a tensão superficial e interfacial, são medidas de efetividade destes compostos^{2, 16}. Concentrações de sal, impurezas e pH influenciam a CMC de alguns surfatantes; por exemplo, um ramnolípido produzido por *Pseudomonas sp.* MUB tem uma CMC de 5 mg/L a pH 3 e 30 mg/L a pH 9²⁴.

A biodegradabilidade, especificidade, temperatura e pH de estabilidade, toxicidade, e solubilidade, são características importantes de um surfatante quando relacionadas a um processo de produção industrial em que esta substância seja utilizada. A possibilidade de adequar o produto de maneira que este

²³ GRIFFIN, W. C.; Classification of surface-active agents by "HLB", Journal of the Society of Cosmetic Chemists, V. 1: 311 - 313, 1949.

²⁴ LANG, S.; GIBBON, A.; SYLDATK, C. and WAGNER, F. Surfactant in solution,. In: MITTAL K. L and LINDMANN eds. Plenum, New York,. 1365 - 1376, 1984.

se torne mais eficaz, implica em redução de custos de produção. É muito vantajoso utilizar um surfatante cujo espectro de ação não seja influenciado em decorrência das condições do processo.

Com relação aos surfatantes sintéticos convencionais, os biossurfatantes em geral detêm características e vantagens distintas:

- ✓ Atividade superficial e interfacial: biossurfatantes são mais eficientes e mais efetivos do que, por exemplo, os aniônicos sulfonados, uma vez que possuem uma menor tensão superficial em baixas concentrações de produto²⁵;
- ✓ Estabilidade térmica: alguns biossurfatantes e sua atividade superficial não são afetados por temperaturas superiores a 90°C. O lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 horas³. Glicolípídeos produzidos por *A. paraffineus*, *T. bambicola* e *P. fluorescens* são estáveis a temperaturas entre 20 e 90° C²⁴.
- ✓ Estabilidade a pH e a força iônica: surfatantes microbianos são estáveis a uma ampla faixa de pH. Surfatante de *Nocardia* sp. L- 417 foi estável a uma faixa de pH de 2 a 12²⁶, bem como frente a teores de sal superiores a 10%, enquanto 2-3% já são suficientes para desestabilizar surfatantes químicos sintéticos⁴.
- ✓ Biodegradabilidade: São substâncias facilmente degradadas em água ou em solo, potencializando sua utilização em biorremediação e tratamento de resíduos^{4, 16};
- ✓ Formação de emulsões: Emulsões formadas por biossurfatantes podem ser facilmente quebradas por adição de pequenas quantidades de enzimas⁴.
- ✓ Baixa toxicidade, permitindo sua utilização para consumo humano em alimentos, produtos cosméticos e fármacos⁴.

²⁵ COOPER, D.G. ; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. Applied and Environmental Microbiology, 47 (1): 173 - 176, 1984.

²⁶ KIM, H.S.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D. and LEE, T. H.; Purification of biosurfactans from *Nocardia* sp. L-417, Biotechnology Applied Biochemistry, 31: 249 - 253, 2000.

3.1.2 Função fisiológica

O papel desempenhado pelos biossurfatantes nas células microbianas ainda não é completamente compreendido. Entretanto, muitos esforços têm sido investidos e algumas atribuições apontadas:

- O envolvimento na emulsificação de substratos insolúveis em água^{27, 28, 29}.
- Solubilização ou quebra de hidrocarbonetos propiciando o crescimento celular em meios contendo este substrato²⁷,
- O transporte de hidrocarbonetos; biossurfatantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis*, promoveram um aumento significativo da porção lipídica do glicolípido de membrana, detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, fato não observado quando o mesmo microrganismo cresce em meio contendo glicose, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido graxo presente na superfície celular poderia estar envolvido no transporte de hidrocarbonetos dentro da célula³⁰;
- Biossurfatantes têm sido relacionados ao fenômeno aderência/liberação de células. A excreção de biossurfatantes em uma superfície ocasiona a formação de um filme interfacial que estimula a adesão de alguns microrganismos enquanto inibe a aderência de outros, revelando uma das mais espetaculares estratégias de sobrevivência dos microrganismos, a habilidade em colonizar um nicho onde possam se multiplicar, ou se desligar deste quando as condições nutricionais são desfavoráveis^{31, 32}.

²⁷ FRANCY, D.S.; THOMAS, J.M.; RAYMOND, R. L and WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal Industrial Microbiology*. 8: 237 - 246, **1991**.

²⁸ OBERBREME, A.; MULLER-HURTIG, R.; and WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactant on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Applied Microbiology Biotechnology*. 32: 485 - 489, **1990**.

²⁹ ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant) *Applied Environmental Microbiology*, 58: 3276 - 3282. **1992**.

³⁰ KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. *Journal of Bacteriology*, 131: 917 - 921, **1977**.

³¹ ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 154 - 162, **1999**.

³² ROSENBERG, E.; Microbial surfactant. *Critical Review Biotechnology*, 3: 109 - 132, **1986**.

▪ A atividade antibiótica^{33, 34}, demonstrada por vários biossurfatantes, embora ainda obscura, é frequentemente relacionada às propriedades anfipáticas das moléculas que os compõem. Os ramnolipídeos de *P. aeruginosa*^{1, 35} e a surfactina de *B. subtilis*^{36, 37} funcionam como antibióticos, solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfatantes no meio, esses microrganismos apresentam maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes¹.

A função fisiológica desempenhada pelos biossurfatantes necessita ainda de muita investigação científica, do desenvolvimento de tecnologias adequadas e, sobretudo da associação entre as áreas de interesse, visando elucidar o papel de tais substâncias nos organismos.

3.2 Biossíntese de surfatantes e genética de microrganismos

3.2.1 Biossíntese

Considerando a composição dos biossurfatantes, é salutar associar sua biossíntese à síntese de lipídeos, de carboidratos e da ligação entre estas duas partes, de tal modo que o metabolismo dos microrganismos, no que diz respeito à produção de surfatantes e ao tipo de biossurfatante produzido, está intrinsecamente associado à fonte de carbono.

³³ HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H.P. Extra-cellular microbial lipids as biosurfactants. *Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology*, 33: 53 - 93, **1986**.

³⁴ SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, 22: (3)142 - 146, **2004**.

³⁵ ITOH, A.; HONDA, H.; TOMITA, F.; and SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *Journal Antibiotics*. 24: 855 - 859, **1971**.

³⁶ CARRILLO, C.; TERUEL, J.A.; ARANDA, J. F.; ORTIZ, A.; Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 161: 91 - 97, **2003**.

³⁷ NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; COSTA, G. A. N.; GILIOLI, R.; MEURER, E. C.; GATTI, M. S. V.; EBERLIN, M. N.; HOËHR, N. F.; PASTORE, G. M. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *B. subtilis* in cassava wastewater medium. *Food Science and Biotechnology*, 13 (5): 591-596, **2004**.

A grande diversidade estrutural apresentada pelos surfatantes, reflete a variedade e complexidades das suas rotas biossintéticas. Dentre as propostas de biossíntese, se distinguem aquelas que tratam a síntese de uma das frações, a hidrofóbica ou a hidrofílica componente dos biossurfatantes, como sintetizada naturalmente enquanto que a outra fração é induzida pelo substrato. Outra hipótese se baseia na ocorrência da síntese natural de ambas as frações (polar e apolar) a partir de duas vias independentes³⁸.

A síntese de soforolipídeos por *Torulopsis magnoliae* é aumentada com a adição de ácidos graxos de cadeias longas ou hidrocarbonetos. Efeito similar é observado na obtenção de glicolipídeos por suplementação do meio com óleos vegetais. Já fontes hidrossolúveis, como glicose, tem sido utilizadas melhorando o rendimento na produção de lipopeptídeos por *B. subtilis*³⁹. A adição concomitante de compostos lipofílicos e hidrofílicos como fonte de carbono, aumenta a produção de glicolipídeos por *T. bambicola*²⁵, evidenciando que a biossíntese do surfatante pode ser regulada tanto pelo metabolismo de lipídios como pela via glicolítica¹⁸.

A utilização de hidrocarbonetos como substrato, envolve principalmente o mecanismo lipolítico e gliconeogênico¹⁸. A limitação de nutrientes como fósforo e nitrogênio pode elevar os níveis de lipídeos e conseqüentemente a produção de biossurfatantes, como observado na produção de ramnolipídeos por

³⁸ SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. eds. Biosurfactants and biotechnology. Surfactant Science Series. v. 25, Dekker, New York, p. 89 - 120, 1987.

³⁹ SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 12: 370 - 375, 1990.

cultivos de *P. aeruginosa* sob limitação de fósforo^{40, 41} ou a produção do lipopeptídeo surfactina de *B. subtilis* que é fortemente influenciada pelo metabolismo de nitrogênio⁴².

O controle do metabolismo intermediário de carboidratos é muito importante para a produção de surfactina. A fração hidrofóbica é formada em nível de transformação da acetil-CoA pela isocitrato desidrogenase no ciclo de Krebs. A produção de surfactina se inicia a medida em que a atividade da isocitrato desidrogenase diminui¹⁶. Com a redução da atividade da isocitrato desidrogenase ocorre o desvio do metabolismo de *B. subtilis* do ciclo de Krebs, fonte de energia, para o acúmulo de lipídeos, com consequente aumento nos níveis de surfactina⁴³.

Carboidratos como sacarose e frutose e minerais como manganês⁴⁴ e ferro⁴⁵ foram mencionados como estimulantes da produção de biosurfatantes. Foi observado um aumento de dez vezes na produção de surfactina quando a concentração de ferro no meio foi aumentada, resultando em níveis maiores que os atribuídos a cepas geneticamente selecionadas⁴⁶, enquanto que a presença de glicerol diminuiu a

⁴⁰ MULLIGAN, C.N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, 12: 199 - 210, **1989**.

⁴¹ REISER, J.; KOCH, A.K.; JENNY, K.; KAPPEL, O. Structure, properties, and production of biosurfactants. In: *Advances in Applied Biotechnology Series*, v.3: *Biotechnology for aerospace applications*. ORINGER, J.W.; TILLINGUEST, H.S. eds., Gulf Publishing Company, London, 85 - 97, **1989**.

⁴² DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 322 - 329, **1999**.

⁴³ De-ROUBIN, M.R.; MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B. F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase. *Canadian Journal of Microbiology*, 35: 854 - 859, **1989**.

⁴⁴ COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 408 - 412, **1981**.

⁴⁵ WEI, Y.H. ; WANG, L. F. AND CHANG, J. S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress*, 20: 979 - 983, **2004**.

⁴⁶ WEI, Y.H. ; CHU, I.M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 724 - 728, **1998**.

produção de surfactina⁴⁷. Contrário a outros biossurfatantes, a biossíntese deste composto não é favorecida pela presença de hexadecano e/ou demais hidrocarbonetos³⁹.

Para maximizar a produção de biossurfatantes é necessário identificar e entender os fatores que influenciam o metabolismo dos microrganismos. O esclarecimento deste fenômeno pode levar a manipulação de culturas e de substratos no sentido de controlar as etapas limitantes na via sintética destes compostos.

3.2.2 Genética

Embora um diagnóstico sobre o uso da tecnologia genética na produção de biossurfatantes ainda se encontre em estágio inicial, o uso de técnicas de DNA recombinante para manipulação da produção destes compostos pode ser um instrumento tanto para pesquisas científicas como para o desenvolvimento comercial em maior escala num futuro próximo.

A manipulação genética de microrganismos através de métodos como clonagem, expressão, supressão e transferência de genes tem revelado resultados interessantes, aumentando as quantidades de biossurfatantes. Dentre os microrganismos produtores de agentes tensoativos, os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são alvos de estudos mais recentes⁴⁸.

Estudos envolvendo a síntese de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* reportaram um grupo de genes associados à regulação da ramnosil transferase, identificado como responsável pela síntese deste composto². A expressão de genes *rhlAB* em *P. fluorescens* e *P. putida* KT-2442 determinaram a produção de ramnolipídeos. Já, em *E. coli* a enzima responsável foi sintetizada, porém não houve produção⁴⁹.

⁴⁷ PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 553 - 563, 1999.

⁴⁸ MULLIGAN, C.N.; CHOW, T.Y. K. and GIBBS, B.F. Enhanced biosurfactant production by a mutant *Bacillus subtilis* strain.. *Applied Microbiology Biotechnology*, 31: 486 - 489, 1989.

⁴⁹ OCHSNER, U. A.; REISER, J.; FIECHTER, A.; and WITHOLT, B. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactant in heterogeneous host. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 3503 - 3506, 1989.

Mutantes de *B. subtilis* modificados por radiação ultravioleta, tiveram a produção de biossurfatante potencializada, produzindo aproximadamente 3,5 vezes mais do que a cepa original⁴⁸.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos de triagem simples e rápidos para detecção de microrganismos produtores de biossurfatantes tem tido um impacto importante nas pesquisas bioquímicas e genéticas relacionadas à degradação de compostos hidrofóbicos. Genes responsáveis pela produção de biossurfatantes têm sido isolados, caracterizados e clonados em hospedeiros heterogêneos^{49, 50}. Esse avanços são responsáveis pelo aumento do rendimento de biossurfatantes em muitas vezes, portanto, é plausível afirmar que linhagens microbianas "hiperativas" podem ser obtidas através de engenharia genética a fim de se obter biossurfatantes mais potentes e em quantidades substanciais².

3.3 "Screening" para obtenção de biossurfatantes:

A escolha de métodos analíticos para a observação da produção ou a sua ausência no meio de cultivo são tão importantes quanto a escolha do substrato, do microrganismo envolvido e dos parâmetros de cultivo, enfim, está relacionado à otimização das condições de produção.

3.3.1 Métodos de detecção

Métodos específicos para a detecção de produção de biossurfatantes podem envolver tempo e grande quantidade de ensaios.

Assim, medida de tensão superficial (TS) e interfacial (TI) e a cromatografia de camada delgada (CCD) tem sido as análises mais utilizadas¹. Embora esses métodos não sejam apropriados para estudos quantitativos, medidas de TS e TI são bons parâmetros para a escolha de microrganismos produtores de

⁵⁰ HARDEGGER, M.; KOCH, A.K.; OCHSNER, U. A.; FIECHTER, A.; and REISER, J. Cloning and heterologous expression of a gene encoding an alkane-induced extracellular protein involved in alkane assimilation from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 3679 - 3687, 1989.

biossurfatantes⁵¹. Já a CCD apesar de semi-quantitativa se associada a um sistema de solventes adequado, não é indicada quando uma grande quantidade de ensaios está envolvida, como no estudo de otimização de produção, já que demanda longo tempo de análise e envolve um alto custo numa etapa inicial do processo¹.

A determinação da atividade molhante, pela medida do diâmetro e ângulo de contato da gota, apresenta similaridades às medidas de TS e TI^{11, 52}. A capacidade de emulsificação também está diretamente correlacionada a atividade superficial, e portanto é utilizada como método de detecção de compostos tensoativos⁵³.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido amplamente usada, para detectar, quantificar e purificar biomoléculas, pois exibe alta especificidade e sensibilidade além da possibilidade de avaliar grandes quantidades de amostras. Esta técnica se tornou bastante utilizada para tensoativos microbianos com o desenvolvimento de CLAE de fase reversa⁵⁴.

A escolha de um método adequado para detectar a produção de tensoativos é um parâmetro chave num "screening", a partir daí os esforços devem priorizar a otimização de produção e consequentemente a quantificação do produto obtido.

⁵¹ AKIT, J. COOPER, D.G.; MANNINEN, K. I.; and ZAJIC, J.E.; Investigation of potential biosurfactant production among phytopathogenic *Corynebacteria* and related soil microbes. *Current Microbiology*, 6: 145 - 150, **1981**.

⁵² MATSUYAMA, T.; MURAKAMI, T.; FUGITA, M. and YANO, I. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *Journal of genetics microbiology*, 132: p. 865 -867, **1986**.

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

⁵⁴ LIN, S.C.; SHARMA, M.M.; GEORGIU, G. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Biotechnology Progress*, 9: 138 - 135, **1993**.

3.3.2 Seleção do microrganismo

Uma boa estratégia de seleção de microrganismos é a chave para encontrar aqueles que apresentem capacidade de sintetizar tensoativos. Os métodos mais utilizados envolvem as propriedades químicas e fisiológicas destes compostos.

A atividade hemolítica e/ou antibiótica apresentada por alguns biossurfatantes, torna-os passíveis de serem utilizados na seleção de microrganismos produtores destas substâncias. Em placas de Petri contendo ágar sangue, tensoativos produzidos pelas cepas investigadas promovem a ruptura dos eritrócitos com consequente formação de halos mais claros em volta da cultura testada^{36, 55}.

A comparação de três métodos para detectar a produção de biossurfatante por diversos microrganismos evidenciou que as culturas devem ser analisadas pelo método da gota pendente e que as culturas consideradas positivas para a presença de surfatantes apresentam moderada ou alta produção do composto. A concentração de biossurfatante produzido por tais cultivos pode ser avaliada pela técnica de espalhamento de óleo e, finalmente, a tensão superficial deve ser usada para confirmar os resultados⁵⁶.

De posse de uma metodologia adequada para o estágio inicial do estudo da produção, onde se define o microrganismo produtor e o método de detecção do composto de interesse, outros parâmetros inerentes ao meio de cultivo, ao requerimento nutricional do microrganismo, condições adequadas de fermentação devem ser avaliados a fim de que se obtenha eficiência de produtividade.

⁵⁵ MULLIGAN, C.; COOPER, D. G. Pressate from peat dewatering as a substrate for bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(1): 160 - 162, 1985.

⁵⁶ YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAP, R. M.; and McINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 56: 339 - 347, 2004.

3.4 Produção e recuperação de biossurfatantes

3.4.1 Produção

Em razão dos altos custos de produção, baixos rendimentos e os processos de separação normalmente trabalhosos, os biossurfatantes não são amplamente explorados.

Sabendo-se das propriedades destes compostos e da importância que estes assumem nas mais variadas áreas de aplicação, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a obtenção destas moléculas de forma economicamente viável possibilitando a competição com os surfatantes sintéticos⁹. Para tanto, a utilização de substratos de baixo custo, o aumento do rendimento e da produção, otimização dos processos produtivos, redução de gastos e a produção de surfatantes microbianos apropriados para aplicações específicas são alternativas que devem ser exploradas¹⁶.

3.4.1.1 Fatores que afetam a produção de biossurfatantes

O tipo, qualidade e quantidade de biossurfatante produzido, são influenciados pela natureza do substrato, a concentração de íons nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês presentes no meio de cultura^{22, 33, 57}, assim como pelas condições ambientais².

A fonte de carbono exerce influência indutiva ou repressora na síntese de biossurfatantes. Fontes de carbono solúveis em água como glicerol e glicose são utilizados como substrato por *Pseudomonas spp.* na produção de biossurfatantes, no entanto, os rendimentos obtidos são menores do que aqueles alcançados quando as fontes de carbono são imiscíveis em água como n-alcanos e óleo de oliva, um indício de mecanismo indutivo dado pela natureza da fonte de carbono⁵⁸. Cepas de *B. subtilis* produtoras de surfatantes têm a produção inibida na presença de hidrocarbonetos, um mecanismo repressor é ativado

⁵⁷ ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation - bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 52: 149 - 156, 1991.

⁵⁸ ROBERT, M.; MERCADE, M.E.; BOCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44TI. *Biotechnology Letters*, 11: 871- 874, 1989.

na presença de compostos hidrofóbicos³⁹. Evidências contundentes levam a conclusão de que a fonte de carbono, particularmente o carboidrato utilizado, tem um grande impacto no tipo de biossurfatante produzido².

Quando *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558, foi cultivado em D-glicose, suplementação com hexadecano durante a fase estacionária, induziu um acréscimo do composto obtido; os mesmos autores relataram a produção de grandes quantidades de biossurfatante ligados às células de *Corynebacterium lepus* nas mesmas condições².

Constituintes como a fonte de nitrogênio afetam a biossíntese de surfatantes. Dentre vários sais inorgânicos testados quanto a produção de tensoativos, os sais de amônio e uréia foram metabolizados preferencialmente por *Arthrobacter paraffineus*, já os nitratos revelaram-se como melhores fonte de nitrogênio para produção de surfatantes por *P. aeruginosa*^{58, 59} e *Rhodococcus sp.*⁶⁰. A estrutura de surfactina de *Bacillus subtilis* é influenciada pela concentração de L-aminoácidos no meio⁴⁷, enquanto que, *A. paraffineus* e *Bacillus licheniformis* têm sua produtividade incrementada a partir da adição destes compostos^{2, 61}.

Cultivos de *Pseudomonas sp.*, *C. tropicallis* IIP-4 e *Nocardia* SFC-D, sob limitação de nitrogênio apontam um incremento da produção, além de evidenciar esta condição como fator determinante na composição do composto⁶².

⁵⁹ GUERRA-SANTOS, L.H.; KAPPELI, O.; FLECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Applied Microbiology and Biotechnology, 24: 443 - 448, 1986.

⁶⁰ ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and evaluation. Acta Biotechnologica, 11(4): 315-324, 1991.

⁶¹ YAKIMOV, M.M.; FREDRICKSON, H.L. and TIMMIS, K.N. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenisin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus liqueniformis* BAS50. Biotechnology Applied Biochemistry 23: 13 -18, 1996.

⁶² SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas sp.* DSM 2874 grown on n-alkanes. Zeitschrift Naturforschung, 40c: 51 - 60, 1985.

Estudos indicam que a quantidade absoluta de nitrogênio e não a sua concentração relativa parece ser importante no rendimento da biomassa, entretanto, a concentração da fonte de carbono hidrofóbica determina a conversão de carbono disponível em biossurfatantes⁶³.

A limitação de cátions multivalentes, Mg, Ca, K, Na, e traços de alguns sais, ocasionam um melhor rendimento de biossurfatantes por *P. aeruginosa* DSM 2659⁵⁹, todavia, para *B. subtilis*, a adição de Fe³⁺ e Mn²⁺ incrementou a produção de surfactina⁴⁴, comportamento similar foi observado para *Rhodococcus sp*⁶⁰ e para *Candida lipolytica* pela presença de íons fosfato e potássio⁶⁴.

Fatores ambientais e condições de crescimento, como pH, temperatura, agitação e oxigênio disponível exercem efeitos sobre o crescimento e atividade celular de microrganismos e consequentemente na produção de biossurfatantes.

O pH do meio tem um importante papel na produção de soforolipídeos por *T. bombicola*⁶⁵ e ramnolipídeos por *P. aeruginosa*, estes são produzidos numa faixa de 6,0 a 6,5, em pH acima de 7,0 a produção é abruptamente comprometida⁵⁹. ABU-RUWAIDA *et al* (1991) mostraram em seus estudos, que a tensão superficial e a concentração micelar crítica (CMC) de biossurfatantes permanece estável numa ampla faixa de pH, enquanto a emulsificação se mantém estável num limite mais estreito⁶⁰.

Variações de temperaturas não provocam grandes alterações nas propriedades superficiais e na eficiência de emulsificação dos biossurfatantes, algumas moléculas desta natureza são estáveis a amplas oscilações de temperatura, suportando temperaturas de esterilização^{14, 60}, porém, durante a etapa de produção, modificações estruturais podem ocorrer nos biossurfatantes em decorrência de mudanças de temperatura^{2, 38}.

⁶³ HOMMEL, R. K.; STUWER, O.; STUBER, W.; HAFFERBURG, D.; and KLEBER, H. P. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules, In: Biosurfactants: production, properties, applications. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 3 - 63, 1993.

⁶⁴ VANCE-HARROP, M. H.; GUSMÃO, N. B.; TAKAKI, G. M. C.; New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources, Brazilian Journal Microbiology, 34: 120 - 123, 2003.

⁶⁵ GOBBERT, U.; LANG, S.; WAGNER, F.; Sophorose lipid formation by resting cells of *T. bombicola*. Biotechnology Letters, 6: 225 - 230, 1984.

O aumento da velocidade de agitação provoca a diminuição do rendimento de surfatante de *Nocardia erythropolis*⁶⁶, enquanto que leveduras produtoras destes compostos têm a produção incrementada em virtude do aumento da aeração².

A concentração salina também afeta a produção de biossurfatantes dependendo do efeito deste parâmetro sobre a atividade celular⁶⁰.

3.4.1.2 Meio de cultivo

Observando a necessidade fisiológica de cada microrganismo, assim como o seu requerimento nutricional, as condições e o comportamento do cultivo são dadas pela produção de metabólitos que por sua vez deve ser monitorada no sentido de maximizar o produto alvo.

O papel relevante desempenhado pelo meio e pelas condições de cultivo no metabolismo do microrganismo imprime variações no tipo e no rendimento do biossurfatante obtido, assim como no mecanismo de indução e repressão da síntese de biossurfatantes.

A produção de biossurfatante é em geral associada ao crescimento da cultura, às condições de cultivo como pH, temperatura e agitação e a utilização do substrato^{59, 60}. A produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas spp*, glicoproteínas por *P. fluorescens* 378, agente tensoativo por *B. cereus* IAF346 e biodispersan por *Bacillus sp.* IAF 343, são exemplos de crescimento associado a produção de biossurfatante².

A produção sob limitação de crescimento, caracterizada pelo aumento agudo nos níveis de biossurfatante, e a super produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas spp.* em substrato n-alcanos⁵⁸ quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento devido à limitação de nitrogênio, fósforo ou ferro, são exemplos de produção não associada ao crescimento celular⁵⁹.

⁶⁶ MARGARITIS, A.; KENEDY, K. and ZAJIK, J. E.; Application of an air lift fermenter in the production of biosurfactants. *Developments in Industrial Microbiology*, 21: 285 - 294, **1980**.

Com relação ao substrato fonte de carbono, muitos compostos, desde hidrocarbonetos, carboidratos a óleos vegetais, têm sido utilizados. Alguns microrganismos produzem surfatantes somente na presença de hidrocarbonetos, outros de carboidratos, e há ainda os que utilizam muitas outras fontes conjunta ou separadamente⁶⁷.

A modificação do substrato freqüentemente altera a estrutura do produto e, conseqüentemente, suas propriedades⁶⁸. Alguns microrganismos mostram restrições quanto a produção de biossurfatantes; *Candida lipolytica* produz biossurfatantes somente em hidrocarbonetos, embora a fonte destes possa ser materiais de baixo ou nenhum custo¹⁶. Já *Bacillus subtilis* produz surfactina somente a partir de fontes de carbono hidrossolúveis⁴⁴.

Substratos alternativos como óleo de oliva e milho, subprodutos agroindustriais, melaço, resíduos do processamento de batata e mandioca foram usados como fonte de carbonocom resultados relevantes, evidenciando a enorme possibilidade destes substratos^{69, 70, 71, 72}.

As fontes de nitrogênio utilizadas na produção de biossurfatantes são muito variadas, incluem desde fontes orgânicas complexas como milhocina, peptonas, farinha de peixe, uréia e autolisado de leveduras, até fontes inorgânicas como nitrato e sulfato de amônio e outros, seu metabolismo depende do microrganismo utilizado¹⁶.

⁶⁷ BANAT, I.M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal - state of art (review). *Acta Biotechnologica*, 15 (3): 251 - 267, **1995b**.

⁶⁸ REISER, J.; KOCH, A.K.; JENNY, K.; KAPPELI, O. Structure, properties, and production of biosurfactants. In: *Advances in Applied Biotechnology Series*, v.3: Biotechnology for aerospace applications. ORINGER, J.W.; TILLINGUEST, H.S. eds., Gulf Publishing Company, London, p. 85 - 97, **1989**.

⁶⁹ MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 74 (7): 887 - 889, **1997**.

⁷⁰ MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - a review. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2:(2) 237-241, **1999b**.

⁷¹ MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 71 (1): 61 - 64, **1994**

⁷² NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using Cassava processing effluent. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 112: (3) p. 163 - 172, **2004**.

A produção de biossurfatantes a partir de fontes renováveis e de baixo custo como óleos vegetais de uso doméstico⁷³, resíduos agroindustriais^{72, 74}, tem sido alvo de investigações com excelentes resultados e combinado a tecnologias de fermentação em grande escala, engenharia genética e metabólica, poderá consolidar o sucesso comercial destes compostos.

3.4.2 Extração

A extração e isolamento de biossurfatantes do meio de cultivo é responsável por mais de 60% dos custos totais de produção, e está principalmente relacionado a sua carga iônica, solubilidade e localização celular, neste caso, intra, extracelular ou associados a membranas².

Nos biossurfatantes extracelulares solúveis em água, várias etapas de concentração são necessárias; ao passo que os extracelulares ligados às paredes celulares ou os insolúveis em água são mais facilmente recuperados¹. Os compostos intracelulares demandam maiores custos de extração, já que envolve rompimento celular por meios mecânicos ou enzimáticos, adicionando mais uma etapa ao processo¹⁶. Biossurfatantes associados a membranas, como os fosfolípidos de *Micrococcus cerificans*, podem ser facilmente isolados da massa celular por extração com solventes orgânicos, já, glicolípidos de *Torulopsis bombicola*, insolúveis em água, podem ser separados do meio por centrifugação^{1, 25}. No caso de biossurfatantes intracelulares, as manoproteínas de levedura são obtidas por aquecimento que visa romper a parede celular, seguido de centrifugação e extração com solventes orgânicos⁷⁵.

A composição do meio de cultivo pode determinar a forma de produção de biossurfatantes; *Corynebacterium lepus* produz um biossurfatante associado a membrana celular quando cultivado em

⁷³ MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 58: 428 - 434, 2002.

⁷⁴ FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. Bioresource Technology, 75: 235 - 240, 2000.

⁷⁵ CAMERON, D. R.; COOPER, D. G. and NEUFELD, R. J.; The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier, Applied Environmental Microbiology, 54: 1420 -1425 , 1988.

glicose, o mesmo microrganismo em meio hexadecano produz um composto extracelular, já em cultivo contendo etanol ou acetato, o composto produzido é 75% intracelular¹⁶.

A técnica mais utilizada para a recuperação de biossurfatantes é a extração com solventes orgânicos como metanol, butanol, diclorometano, acetato de etila, pentano, hexano, ácido acético, clorofórmio, e outros. Os trealolipídeos, soforolipídeos e liposan são exemplos de biossurfatantes extraídos com solventes².

A precipitação com sulfato de amônio é utilizada para a extração de emulsan e biodispersan. A surfactina e outros biossurfatantes produzidos por *Bacillus* podem ser extraídos por precipitação ácida, ajustando o pH do meio para o ponto isoelétrico do composto desejado, enquanto que biossurfatantes de *Pseudomonas sp.* e *Candida tropicalis* são extraídos por precipitação com acetona⁷⁶.

A ultrafiltração para a separação de biossurfatantes do meio de fermentação, tem sido utilizada baseada na capacidade dos biossurfatantes em formar micelas ou agregados acima da CMC, podendo então, ser retidos em membranas de exclusão de alto peso molecular⁷⁷.

A surfactina de *B. subtilis* pode ser removida do meio de cultura através da captação da espuma formada durante a fermentação. O tensoativo é posteriormente precipitado por adição de ácidos e extraído com solventes. Praticamente toda a surfactina permanece na espuma, diminuindo perdas e permitindo a remoção contínua e *in situ* do produto⁴⁴. A técnica de fracionamento da espuma oferece a vantagem de remoção contínua do surfatante do meio de fermentação, sem perda significativa de biomassa, além de impedir a ocorrência de retroinibição⁴⁴. Esta alternativa por si só, é considerada uma etapa de extração e purificação do composto.

⁷⁶ MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 47: 23 - 29, 1990.

⁷⁷ LIN, S.C.; JIANG, H.J. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. *Biotechnology Techniques*, 11(6): 413 - 416, 1997.

Para a extração em larga escala ou para o isolamento contínuo de surfatantes do meio de fermentação, técnicas de cromatografia de adsorção e troca iônica também foram relatadas¹.

3.5 Aplicações

Na nova concepção de industrialização global, onde muitas das indústrias clássicas estão sendo desestimuladas e redirecionadas rumo a tecnologias e biotecnologias emergentes, surgem novas oportunidades de pesquisas e se abrem portas para uma era onde as estratégias se baseiam primeiro em obter produtos que acarretem pouco ou nenhum impacto ambiental e segundo, que atendam aos desejos do consumidor. Assim sendo, o mercado mundial de biotecnologia que detinha 25 milhões de dólares em 1980, chega ao final do século 20 com uma expectativa que deve exceder os U\$ 500 bilhões⁷⁸. A demanda por surfatantes aumentou 300 % na última década⁷⁸, com uma produção mundial de 17 - 19 milhões de ton/ano⁶, o que representa uma generosa fatia dentro deste mercado.

A maioria dos surfatantes comercializados, são de origem sintética, principalmente derivados de petróleo, entretanto, um rápido avanço da biotecnologia, as crescentes exigências dos consumidores por produtos de qualidade, aliado a novas legislações onde a preocupação ambiental é constante, o desenvolvimento e comercialização de surfatantes biológicos tem ganhado ímpeto como possível alternativa para estes produtos⁷⁸.

Até a década de 90, o grande mercado para os biossurfatantes foi a indústria petrolífera, onde estes compostos são utilizados no processo de extração de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes⁷⁹. A diversidade química destas moléculas, fornece uma ampla variedade de compostos, com propriedades específicas que permitem aplicações comerciais em múltiplas áreas e por conta disso,

⁷⁸ BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 495 - 508, 2000.

⁷⁹ VAN DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of microbial surfactants. *Biotechnology Advances*, 9: 241 - 252, 1991.

aplicações como a biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e recuperação terciária de petróleo, são relatadas com sucesso. Atualmente, novos mercados têm surgido e abrangem indústrias de produtos farmacêuticos, de higiene e cosmética e indústrias de alimentos⁷⁸.

3.5.1 Aplicações favoráveis ao meio ambiente:

Devido à biodegradabilidade, baixa toxicidade e efetividade em aumentar a biodegradação e solubilidade de compostos, as aplicações de surfatantes voltadas ao meio ambiente têm recebido atenção especial e portanto, favorecido de um modo geral, o comportamento das pesquisas quanto ao tratamento de contaminantes.

A capacidade dos biossurfatantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água, aumentam a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes. Entretanto, os estudos ainda ocorrem em nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biossurfatantes permanece ainda como um desafio⁵⁷.

Os acidentes com petroleiros tornaram-se numerosos e têm causado graves problemas sociais e ecológicos, a biorremediação mostra-se como procedimento viável na recuperação destas áreas, minimizando o impacto ambiental causado pelo derramamento de óleo. Surfatantes de *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Corynebacterium* sp. e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas^{4, 80}.

⁸⁰ NITSCKHE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfatantes a partir de resíduos agroindustriais. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 31: 63 - 67, 2003.

Quando utilizados diretamente no solo, os biossurfatantes podem emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos⁸¹. A biodegradação do pesticida hexaclorociclohexano pelo biossurfatante produzido por *Pseudomonas* Ptm+, assim como de outros organoclorados (DDT e ciclodienos) emulsionados em menor grau, revela essa potencialidade⁸².

A utilização de ramnolipídeos, lipopeptídeos e soforolipídeos como agentes biodegradantes em hexadecano, octadecano, fenantreno em sistemas líquidos ou hexadecano, tetradecano, creosato e misturas de hidrocarbonetos em solos, envolve dois mecanismos, o aumento da solubilidade do substrato nas células microbianas e a interação com a superfície celular⁸³, o que acelera o processo degradativo, viabilizando a aplicação.

Segundo MILLER (1995)⁸⁴, os biossurfatantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo.

Os biossurfatantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são hidrofóbicos e agentes emulsificantes são necessários para dispersá-los em soluções aquosas, como nas formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis em que emulsificante de *Bacillus* é utilizado³¹.

O potencial de ramnolipídeos para o controle biológico de fitopatógenos foi evidenciado por STANGHELLINI & MILLER (1997)⁸⁵, revelando mais uma aplicação para o setor agrícola.

⁸¹ LANG, S.; WAGNER, F. Bioconversion of oils and sugars to glycolipids. In: Biosurfactants: production, properties, applications. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 205-227, 1993.

⁸² BANAT, I.M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 7:80 - 88, 1991.

⁸³ MULLIGAN, C. N.; Environmental applications for biosurfactants, Environmental Pollution, 133: 183 -198, 2005.

⁸⁴ MILLER, R.M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal contaminated soils. Environmental and Health Perspectives, 103: 59-62, 1995.

⁸⁵ STANGUELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants. Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. Plant Disease, 81: 4 -12, 1997.

Os biossurfatantes podem ser utilizados para a dispersão de minerais inorgânicos em mineração e processos industriais. Compostos tensoativos produzidos por culturas de *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp., utilizada para flotação e separação de esquelita (CaWO_4) e calcita (CaCO_3) resultou em 95% e 30% respectivamente. Sabe-se que reagentes químicos convencionais não separam estes dois minerais⁸⁶.

O polissacarídeo aniônico biodispersan, produzido por *A. calcoaceticus* A2, foi utilizado na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água³¹.

As limitações ambientais do mundo em que vivemos, cada vez mais tendem a prevalecer sobre os interesses econômicos e a biodegradabilidade de diversas classes de compostos, incluindo os tensoativos, terá que ser, porventura um dos interesses a defender; assim, a disposição atual do mercado em produzir e utilizar compostos que atendam ao princípio no qual a natureza, por si só tenha a capacidade de desfazê-lo, é uma busca contínua, que culmina sobretudo no desenvolvimento de tecnologias e produtos favoráveis ao meio ambiente.

3.5.2 Aplicações industriais

Visando adequar à legislações mais rigorosas e consumidores que tendem à maior valorização de produtos que atendam a essas especificações e sobretudo sejam de boa qualidade; o setor industrial, tanto da indústria de produção de biossurfatantes quanto as que utilizam tais componentes em seus processos, adquire um aliado potencial com o desenvolvimento e ampliação de tecnologias de produção destas substâncias.

A indústria de petróleo se utiliza de agentes tensoativos em variadas aplicações. Os tanques de estocagem de óleos requerem limpezas periódicas, devido aos resíduos de óleos pesados que sedimentam no fundo destes tanques de estocagem se tornando depósitos sólidos que não são removidos

⁸⁶ KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. eds. Biosurfactants and biotechnology. Surfactant Science Series. v. 25, Dekker, New York, p.247 - 331, 1987.

através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e de custo elevado.

O uso de biossurfatantes que promovam a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão é uma alternativa viável⁸⁴. BANAT *et.al* (1991)⁸², utilizando um biossurfatante produzido pela bactéria Pet 1006, relataram a recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo durante a limpeza de tanques de estocagem.

A MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) é uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual⁸⁷. O microrganismo produz polímeros e surfatantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, pela diminuição das forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros do mineral⁶⁷, ou ainda auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas⁸⁷.

A injeção de microrganismos produtores e sua propagação *in situ*; a suplementação do local com nutrientes estimulando o crescimento de microrganismos selvagens produtores de surfatantes; ou ainda a produção de biossurfatantes em reatores e posterior injeção no reservatório são as estratégias promissoras⁸⁷. Na MEOR *in situ*, os microrganismos devem ser capazes de crescer em condições extremas como alta temperatura, pressão, salinidade e baixa tensão de oxigênio⁸⁸.

A utilização de biossurfatantes como agentes terapêuticos pelas indústrias farmacêuticas, se baseia no tipo e no modo de ação de cada substância e esta em concordância com microrganismo produtor. Inibição da formação de coágulos e hemólise, formação de canais iônicos em membranas,

⁸⁷ BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, 51: 1- 12, 1995a.

⁸⁸ JENNEMAN, G.E.; McINERNEY, M.J.; KNAPP, R.M.; CLARK, J.B.; FEERO, J.M.; REVUS, D.E.; MENZIE, D.E. A halotolerant biosurfactant producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. *Developments in Industrial Microbiology*, 24: 485 - 492, 1983.

atividade antitumoral, antimicrobiana e antiviral são algumas aplicações terapêuticas relacionadas a biossurfatantes de *Bacillus*^{13, 37, 89}.

O biossurfatante produzido por *R. erythropolis* inibiu a multiplicação do vírus do herpes simples e vírus parainfluenza⁹⁰. Um lipopeptídeo produzido por *B. subtilis* apresentou atividade antifúngica sobre leveduras, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular⁹¹. Bactérias entéricas patogênicas foram inibidas por biossurfatante de *Lactobacillus*. Os autores observaram a diminuição da formação de biofilmes em cateteres pela ação de agentes antiadesivos³⁴.

A capacidade de formar emulsões estáveis, aliada a compatibilidade com a pele e cabelos disponibiliza os biossurfatantes para o uso em produtos de higiene e cosméticos⁹².

Alguns soforolipídeos são utilizados comercialmente como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. LTDA desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídeos esterificados, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos².

A preparação de biossurfatantes específicos que exerça atividade sobre alguns componentes culminando num produto final de acordo com a necessidade do consumidor, é possível graças à utilização de enzimas. Aplicações deste tipo fornecem uma nova dimensão à produção de compostos tensoativos, principalmente para aplicação em produtos de higiene e cosméticos⁷⁸.

⁸⁹ PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. Applied Microbiology and Biotechnology, 51: 553 - 563, 1999.

⁹⁰ UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mono and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. Agricultural and Biological Chemistry, 53: 757 - 763, 1989.

⁹¹ THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MICHEL, M.G. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiological Letters, 128:101 - 106, 1995.

⁹² BROWN, M.J. Biosurfactants for cosmetic applications. International Journal of Cosmetic Science, 13:61 - 64, 1991.

Na indústria de alimentos, os biossurfatantes são utilizados como emulsificantes para promover a estabilidade de emulsões e sistemas aerados como na composição de sorvetes, no processamento de matérias primas para obtenção de consistência e textura, além de exercer um importante papel na dispersão e na solubilização de aromas^{78, 93}. A indústria de panificação e produtos cárneos utiliza surfatantes para modificar características reológicas da farinha e na emulsificação de gorduras, respectivamente⁹⁴.

As indústrias de papel, têxtil, cerâmica, química e muitas outras tem utilizado biossurfatantes nos seus processos. O lipossacarídeo, biodispersan tem aplicação na indústria de tintas, facilitando o manuseio, pois as partículas decantam mais lentamente, gerando maior espalhabilidade e aumentando as propriedades de mistura³¹, além do uso na fabricação de extintores, para a estabilização de espuma⁴¹.

Basicamente qualquer indústria ou processo onde atividade superficial e sistemas hidrofílicos e hidrofóbicos heterogêneos são encontrados, há grandes possibilidades para aplicações de agentes superficiais de origem microbiana.

A Tabela 3 mostra as áreas de aplicações dos biossurfatantes e o papel exercido por estas substâncias.

⁹³ KACHHOLZ, T. and SCHLINGMANN, M.; Possible food and agricultural application of microbial surfactants: An assessment. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. eds. Biosurfactants and Biotechnology. Surfactant Science Series. v. 25, Dekker, New York, 183 - 210, 1987.

⁹⁴ VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. Progress in Colloid Polymer Sciences, 72: 12-18, 1986.

Tabela 3 - Principais aplicações comerciais dos biossurfatantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: Banat *et al*, 2000⁷⁸.

Com o aumento dos esforços voltados para o melhoramento de cepas e com a implementação de processo de produção, de novas tecnologias e aplicações, há uma expectativa de que os biossurfatantes estejam envolvidos nos mais versáteis processos químicos e biotecnológicos num futuro próximo.

3.6 Utilização de substratos alternativos para produção de surfatantes

Surfatantes podem derivar tanto de reservas petroquímicas como de fontes renováveis (óleos vegetais ou animais e microrganismos).

O sucesso da produção de biossurfatantes depende do desenvolvimento de processos biotecnológicos economicamente viáveis e sobretudo do uso de matéria prima de baixo custo, em geral responsável por 30% dos custos totais de produção⁵.

A redução de custos na produção de biossurfatantes abrange a seleção e adaptação dos microrganismos envolvidos, o substrato de crescimento, o processamento do subproduto utilizado bem

como o processo de produção do composto alvo⁸⁶, todos estes fatores devem ser vistoriados detalhadamente, de forma a reverter o maior custo / benefício na obtenção do produto final.

Uma das principais dificuldades na seleção de um resíduo como substrato alternativo é encontrar a composição adequada de nutrientes que permitam tanto o crescimento celular como o acúmulo do produto de interesse. Em geral, substratos contendo altos níveis de carboidratos ou lipídeos suprem as necessidades para uso como fonte de carbono na produção de biossurfatantes⁷¹ e têm sido utilizados, com resultados promissores.

A utilização de óleos vegetais de uso doméstico e subprodutos agroindustriais na produção de ramnolipídeos e lipopeptídeos, forneceram resultados interessantes e demonstram a potencialidade destes resíduos como uma alternativa viável em substituição às fontes de carbono tradicionais ^{71, 72, 73, 80}.

Estudos comparando a produção de ramnolipídeos em resíduos industriais de destilaria e soro de leite, evidenciaram que o crescimento específico do microrganismo e a formação do produto, foram melhores para ambos os resíduos, se comparados a um meio sintético, revelando que estes substratos podem ser utilizados com sucesso⁹⁵. *B.subtilis* ATCC 21332, cultivado em resíduos da indústria de batatas ou em meio basal, proporcionou rendimento inferior ao obtido no meio sintético, entretanto, os autores enfatizam a economia obtida e a utilização potencial do produto em biorremediação e MEOR^{74, 96}.

Na produção de biossurfatantes por *B. subtilis*, a utilização de água residual de turfa, resíduo com conteúdo significativo de carboidratos, além de aminoácidos e ácidos orgânicos, mostrou-se adequado para o crescimento e produção de biossurfatante⁵⁵. A mesma espécie de microrganismo, foi responsável pela produção de surfactina quando cultivado em amido³⁹, em resíduo do processamento de batata^{74, 96} ou em meio contendo melaço como fonte de carbono⁶⁹. Recentemente, a utilização de resíduo agroindustrial

⁹⁵ BABU, P.S.; VAIDYA, A.N.; BAL, A.S.; KAPUR, R.; JUWARKAR, A.; KHANNA, P. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnology Letters*, 18(3): 263 - 268, 1996.

⁹⁶ THOMPSON, D.N.; FOX, S.L.; BALA, G.A. Biosurfactants from potato process effluents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84/86 : 917 - 929, 2000.

derivado de mandioca, apresentou um rendimento de 3,0 g /L de surfactina bruta em 48 horas de fermentação⁷².

Substratos lipídicos são os mais indicados para obtenção de ramnolipídeos pelo cultivo de *Pseudomonas* sp. O processamento industrial de óleos e gorduras geram subprodutos passíveis de serem utilizados como fonte de carbono por esses microrganismos⁷¹. Efluentes da prensagem de óleo de oliva (OOME), foram utilizados e *P. aeruginosa* 44T1 produziu 10 g / L de ramnolipídeo⁹⁷.

P. aeruginosa GS9-119 e DS10-129 produziram ramnolipídeos em óleo de soja, óleo de cártamo e glicerol, apresentando maiores rendimentos quando cultivado em óleo de soja, os tensoativos obtidos foram eficientes na emulsificação de hidrocarbonetos⁹⁸, o substrato soro de leite também foi utilizado por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* geneticamente modificadas produzindo altos teores de ramnolipídeos⁹⁹.

Resíduos ricos em carboidrato podem ser convertidos em triglicerídeo por organismos oleaginosos e *T. bombicola* pode converter estes compostos em soforolipídeos extracelulares usados em formulações cosméticas ou na recuperação de petróleo⁷⁰. Água do mar suplementada com óleo de babaçu ou D-glicose foi utilizada por *Candida lipolytica* na produção de bioemulsificante constituídos por carboidratos, proteínas e lipídeos⁶⁴.

Um fator importante a ser considerado quando se pretende estabelecer um processo biotecnológico a partir de substratos alternativos é a dificuldade de padronização devido às variações naturais de composição, bem como a avaliação dos custos de transporte, armazenagem e tratamento

⁹⁷ MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M.J.; ANDRES, C. DE.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*, 43: 1- 6, 1993.

⁹⁸ RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCLEAN, S.; MARCHANT, R. and BANAT, I. M.; Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials, *Biotechnology Progress*, 18: 1277 - 1281, 2002.

⁹⁹ KOCH, A.; REISER, K.J.; KAPELLI, O.; FIECHTER, A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *P. aeruginosa* and their application in biosurfactant production. *Biotechnology*, 6: 1335 - 1339, 1988.

prévio necessários a este subproduto. Contudo, a utilização de resíduos pode diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e custos de tratamento^{14, 73}.

O futuro dos biossurfatantes e surfatantes de fontes renováveis requer uma efetiva análise econômica entre os custos de produção e os benefícios de aplicações⁶.

3.6.1 Manipueira

A mandioca (*Manihot esculenta crantz*) é uma raiz muito utilizada como fonte de alimentação em países tropicais da Ásia, África e América Latina, ocupa a sexta posição no ranking mundial de alimentos cultivados e é considerada a base alimentar de mais de 700 milhões de pessoas nesses países^{100, 101, 102}. A produção mundial desta raiz aumentou de 75 milhões de toneladas em 1965 para 162 milhões em 1999 segundo a FAO/GIEWS¹⁰⁰. Dentre os cinco maiores produtores mundiais, o Brasil ocupa a segunda posição, com um total de 23 milhões de toneladas/ano sendo o maior produtor da América Latina¹⁰⁰.

A industrialização da mandioca, em farinha e fécula, gera aproximadamente 240.000 L de resíduo/mês a partir do processamento de 700 toneladas de raiz (dados de uma indústria de médio porte no estado de S.Paulo)¹⁰³. No processo de fabricação da farinha de mandioca são gerados resíduos como a casca, o farelo e a água de mandioca, dita manipueira¹⁰⁴. Manipueira é uma palavra de origem tupi-guarani que significa “o que brota da raiz de mandioca”.

¹⁰⁰ SOCOL, C. R., Biotechnological products from cassava roots by solid state fermentation. *Journal Science Industrial Research*, 55:358-364, 1996.

¹⁰¹ KATO, M. S. A., SOUZA, S. M. C.; Informe Agropecuário, 13: 9 -16, 1987.

¹⁰² CEREDA, M. P. TAKITANE, L. C., CHUZEL, G., VILPOUX, O., Starch: Potential in Brazil. In: DUFOUR, D., O'BRIEN, G. M., BEST, R. eds. *Cassava flour and starch*. CIAT, Cali Columbia, 19 -24, 1996.

¹⁰³ DEL BIANCHI, V. Balanço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte do estado de São Paulo, 1998. 118 p. Tese doutorado - Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, Botucatu.

¹⁰⁴ BARANA, A. C. Avaliação de tratamento de manipueira em biodigestores fase acidogênica e metanogênica. Botucatu, 2000. 95p. Tese de doutorado em Agronomia, Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP, Botucatu.

A manipueira, proveniente da prensagem das raízes da mandioca é um subproduto que se apresenta na forma de suspensão aquosa constituído por macro e micronutrientes vegetais, é altamente poluente devido a suas concentrações de matéria orgânica não esgotada, que pode atingir 100 g DQO/L; a demanda biológica de oxigênio (DBO) de uma fábrica de porte médio é substancial, em média equivale à carga poluidora de uma cidade de 2 milhões de habitantes¹⁰³, ¹⁰⁵. Além de poluente, o resíduo é tóxico pela presença de glicosídeos cianogênicos, como a linamarina e lataustralina, potencialmente hidrolisáveis a cianeto e ácido cianídrico em presença de ácidos ou enzimas¹⁰⁵.

Tanto a captação como a disposição desse líquido no meio ambiente são fatores relevantes neste processo industrial face a lei Federal 9433, de janeiro de 1997, que trata do controle qualitativo e quantitativo, assim como do uso dos recursos hídricos¹⁰³.

A manipueira, apesar do potencial poluente, é um resíduo constituído por carboidratos, nitrogênio e diversos sais minerais o que a torna passível de ser aproveitada em processos biotecnológicos como na produção de biomassa oleaginosa¹⁰⁶, bioaromas¹⁰⁷, biogás¹⁰⁴ e biossurfatante⁷², ¹⁰⁸.

Inúmeras oportunidades poderiam ser implementadas para o aproveitamento desses resíduos de modo a proporcionar maior rentabilidade financeira para as próprias empresas ou para suas possíveis futuras subsidiárias. A falta de informações sobre a quantificação e caracterização do material gerado durante o processamento, são fatores restritivos de projeções econômicas, técnicas ou mesmo científicas, isso é determinante para a falta de ação no sentido do aproveitamento desses resíduos.

¹⁰⁵ CEREDA, M. P. Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil, São Paulo, Paulicéia, 174p. 1994.

¹⁰⁶ EFING, L.M.A .C.; WOSIACKI, G. Estabelecimento de condições de cultivo de uma cepa de *Trichosporun* sp. isolada de manipueira. Boletim CEPPA, 16(1):23-26, 1998.

¹⁰⁷ DAMASCENO, S. Cultivo de *Geotrichum fragrans* em manipueira, 1999. 114p. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP. Botucatu

¹⁰⁸ SANTOS, C.F.C.; PASTORE, G.M.; DAMASCENO, S.; CEREDA, M.P. Produção de biossurfactante por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Boletim do SBCTA, 33 (2): 157-161, 1999.

A aquisição de culturas, tecnologias e uma preocupação crescente com o desenvolvimento sustentável, viabilizam a utilização deste efluente como substrato para microrganismos, que, além de contribuir com a redução da poluição ambiental proporciona uma drástica redução de gastos na produção de substâncias de interesse como os biossurfatantes.

Tendo em vista o vasto potencial apresentado pelos resíduos agroindústrias como fonte de nutrientes para microrganismos na obtenção de biomoléculas e visando minimizar os custos de produtividade do biossurfatante, a água de mandioca (manipueira), será utilizada como substrato para o cultivo de *Bacillus subtilis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Definição e caracterização do meio de cultivo

4.1.1 Manipueira

O resíduo foi coletado na indústria, conduzido ao laboratório, homogeneizado, e mantido a -18°C .

Para utilização, a manipueira foi descongelada, fervida, resfriada a temperatura ambiente, centrifugada a 10.000 rpm / 20 minutos constituindo, assim, a manipueira F¹⁰⁹, que posteriormente foi autoclavada a 121°C / 25 minutos, 1 atm. em fermentador de bancada.

4.1.2 Composição do substrato

A constituição do resíduo manipueira quanto à determinação de minerais, nitrogênio e carbono foi efetuada de acordo com a EPA-3015 para resíduos líquidos¹¹⁰, pelo Laboratório de Análise de Solos e Plantas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Os carboidratos foram determinados, conforme DANIELS et al. (1994)¹¹¹.

Os Açúcares redutores pelo método SOMOGYI NELSON¹¹².

Sacarose, glicose, frutose e maltose foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Waters (modelo 510 GPC Low-1) acoplado a detector de refração diferencial. Os açúcares presentes nas amostras foram determinados através de comparação dos tempos de retenção de soluções padrões destes sob as mesmas condições.

¹⁰⁹ NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Cassava Flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.106:295 - 302, 2003.

¹¹⁰ SW-846, Test methods for evaluating solid wastes: Physical and chemical methods, 3015, revision september 1994. http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3_series.htm.

¹¹¹ DANIELS, L.; HANSON, R.; PHYLLIPS, J. A. Chemical analysis. In: *Methods for General and Molecular Bacteriology*. GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A. KRIEG, N.R. eds., American Society for Microbiology. 518 - 519, 1994.

¹¹² SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. *Journal of Biology and Chemistry*, 160: 61- 68, 1945.

4.2 Microrganismo

Foi utilizada cultura de *Bacillus subtilis* Lb5a, previamente definido como potencial produtor de biossurfatantes e pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

4.2.1 Manutenção da cultura e inóculo

Para manutenção da cepa foi utilizado ágar nutriente em tubo inclinado. A cultura foi mantida em geladeira (5°C) e repicada periodicamente.

Para padronização do inóculo, o microrganismo mantido em geladeira foi cultivado em placas de Petri contendo ágar nutriente, durante 24 horas a 30°C.

Alças do cultivo foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo nutriente sob diferentes condições de temperatura e agitação, foram tomadas aliquotas para contagem de células viáveis e verificação da densidade óptica a 610 nm. O inóculo padronizado foi transferido para o fermentador de bancada Bioflo IIc New Brunswick Co. com capacidade para 3,6 litros, onde as condições de fermentação foram definidas.

4.2.2 Contagem de células viáveis¹¹³

Foram utilizadas diluições em série, onde 1 mL do meio de cultura foi transferido para tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril, misturados por agitação e aliquotas de 10 µL de cada diluição foram depositadas sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar nutriente, por técnica de espalhamento em superfície. Após incubados em estufa bacteriológica a 30°C, o número de colônias presentes em cada gota foi determinado e expresso em UFC/mL.

¹¹³ MILES, A. A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of blood. *Journal of Hygiene*, 38: 732 - 749, 1938.

4.2.3 Densidade óptica

O aumento da biomassa total do meio de cultivo foi monitorada em espectrofotômetro a 610 nm. Aliquotas foram coletadas em intervalos regulares, utilizando-se o meio isento de células como branco.

A padronização do inóculo foi definida, e três alçadas da cultura foram transferidas para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo nutriente, incubado a 30° C/ 150 rpm durante 8 -10 h. Em seguida foi inoculado no fermentador de bancada Bioflo IIc, para condução da fermentação.

4.2.4 Microscopia de varredura

A cepa de *B. subtilis* LB5a foi cultivada em caldo nutriente por 8 horas e em meio manipueira por 12, 24 e 36 horas. Nestes períodos de fermentação, foram coletadas amostras para observação da morfologia do microrganismo.

A partir do meio líquido, a cultura foi centrifugada em eppendorfs para obtenção de “pellets” que foram submetidos a processo de:

Fixação - Utilizou-se glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 em volume suficiente para cobrir a amostra e manteve-se em repouso durante 4 horas;

Lavagem - Lavou-se 2 vezes (15 min. cada) com tampão fosfato 0,1 M;

Pós- fixação - Utilizou-se tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M, volume suficiente para cobrir as amostras, manteve-se um repouso 2 horas a 4°C;

Lavagem - Lavou-se 2 vezes (15 min. cada) com tampão fosfato 0,1 M;

Desidratação - Utilizou-se solução de acetona nas concentrações:

30%	20 min.
50%	20 min.
70%	20 min.
90%	20 min.
100%	20 min.
100%	20 min.
100%	20 min.

A partir da desidratação, as amostras foram conduzidas para o aparelho de ponto crítico, onde a acetona foi substituída por CO₂, as amostras já devidamente preparadas foram montadas em blocos metálicos, sofreram pulverização com ouro (Sputter) e finalmente foram observadas em microscópio de varredura.

4.3 Cinética de produção do biossurfatante

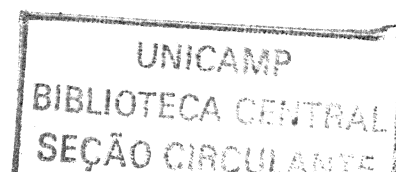
Para avaliar a produção do surfatante, a bactéria *B. subtilis* LB5a, foi cultivada em fermentador de bancada em meio manipuladora F. Um volume de 20 mL da amostra livre de células em diferentes condições e tempos de cultivo foram avaliados quanto à capacidade de reduzir a tensão superficial (TS e CMD), tensão interfacial (TI), concentração micelar crítica (CMC), assim como a concentração de biossurfatante bruto (m/v); também foi verificado o pH do meio de cultivo.

4.3.1 Determinação da Tensão Superficial (TS)

A medida da tensão superficial foi obtida em tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12. Foram utilizados 10 mL de meio de cultivo e as análises foram efetuadas pelo método da placa, utilizando uma placa de platina-irídio com perímetro molhado de 40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm, denominada placa de Wilhelmy. As condições de análise foram temperatura de 20-25°C, intervalos de medidas 10 s, e desvio padrão referente a 5 medidas $\leq 0,20$ mN/m.

4.3.2 Determinação da Diluição Micelar Crítica (CMD)

Alíquotas de 1mL e 0,1mL do meio de cultura foram diluídos de 10 (CMD⁻¹) e 100 vezes (CMD⁻²) em água destilada, sendo as medidas das tensões superficiais das respectivas diluições determinadas conforme descrito em 4.3.1.



4.3.3 Determinação da Tensão Interfacial (TI)

Foi realizada utilizando o método da placa, em tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12. O meio de cultivo livre de células foi utilizado caracterizando a fase pesada e hexadecano como fase leve da mistura.

4.3.4 Concentração Micelar Crítica (CMC)¹¹⁴

A determinação da CMC, que determina a eficiência de um surfatante, foi realizada com o meio isento de células, assim como a partir de solução 1 mg/mL do biossurfatante bruto. Para ambas as formas foram preparadas diluições sucessivas em um volume fixo de água destilada, seguida da determinação da tensão superficial conforme o item 4.3.1. A amostra em análise foi diluída continuamente até a obtenção de valores próximos a tensão superficial da água.

4.3.5 Concentração do biossurfatante bruto

Quanto a sua obtenção, a produção de biossurfatante foi avaliada através do recolhimento da espuma formada durante a fermentação.

Uma primeira etapa da extração foi efetuada a partir da remoção da espuma do meio de cultivo através de uma saída lateral acoplada ao fermentador de bancada. A espuma foi liquefeita naturalmente, centrifugada para remoção de células, sofreu precipitação por adição de HCl até pH 2,0 e foi mantida em repouso a 4°C por 12 horas aproximadamente para completa decantação do produto. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 10.000 rpm/20 minutos, neutralizado a pH 7,0 utilizando NaOH. Foi colocado em cadinhos

¹¹⁴ SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27:110-116, 1987.

de porcelana e levados a estufa de secagem a 50°C e para dessecador até peso constante. A amostra teve o peso determinado por diferença, calculando-se posteriormente a concentração (m/v)¹¹⁵.

4.4 Produção de Biossurfatante

Após a observação dos parâmetros relacionados à produção, a fermentação foi conduzida em fermentador de bancada, utilizando-se 1,5 L de meio manipulada, 30° C, 150 rpm e 1 vvm ar/L meio, pH natural em torno 5,3 sendo que, um tempo de fermentação igual a 36 horas foi determinado como ótimo para a obtenção do tensoativo.

O consumo dos carboidratos presentes no meio de cultura pela bactéria utilizada foi avaliado a partir de amostras coletadas a cada 12 horas de fermentação.

Foram avaliados o conteúdo de carboidratos totais conforme DANIELS *et al.* (1994)¹¹¹ e os açúcares redutores (ART) pelo método Somogyi Nelson (1945)¹¹².

4.5 Extração e purificação do composto

4.5.1 Extração

O produto adquirido conforme descrito no item 4.3.5 foi ressuspenso em clorofórmio/metanol (65:15) e filtrado em papel de filtro comum. O filtrado foi evaporado utilizando evaporador rotativo a 40°C. O produto assim obtido, dito biossurfatante bruto foi utilizado em algumas aplicações descritas posteriormente.

4.5.2 Purificação em cromatografia de adsorção

Foi utilizada coluna (40 x 5,0 cm) e sílica gel 60 como fase estacionária. Amostras de 1,0 g do produto bruto foram diluídas em clorofórmio/metanol (2:1), e eluído com solventes de polaridade crescente na ordem: clorofórmio/metanol (2:1), clorofórmio/metanol (1:1), clorofórmio/metanol (1:2) e metanol puro.

¹¹⁵ MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2 (3): 367-372, 1999a.

Foram recolhidas frações de aproximadamente 10 mL e a presença do produto de interesse foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD).

Pequenos volumes de cada fração recolhida foram aplicados em placas de sílica gel (3 x 5 cm) utilizando capilares. Foi empregado como fase móvel clorofórmio/metanol/água (65:15:1) e revelados com aquecimento. A presença do biossurfatante foi monitorada pela comparação dos tempos de retenção de cada fração, comparados a um padrão de surfactina (Sigma[®]). As frações onde detectou-se a presença do surfatante foram reunidas e evaporadas em rotaevaporador a 40°C.

O produto aqui obtido foi designado biossurfatante semi-purificado.

4.5.3 Cromatografia de adsorção em Sephadex LH20

Visando obter um produto mais puro para aplicações biológicas, foi utilizado cromatografia de adsorção em coluna (25 x 2 cm) empregando Sephadex LH20.

O biossurfatante semipurificado foi devidamente pesado, diluído, aplicado e eluído sob pressão com o seguinte gradiente de solventes: H₂O (100%), H₂O:metanol (1:1), metanol 100% e acetona (100%).

A presença do produto foi monitorada em CCD conforme descrito no item 4.5.2.

O produto obtido foi utilizado para caracterização, atividade antimicrobiana e antitumoral.

4.6 Caracterização

4.6.1 Conteúdo protéico e lipídico

O conteúdo de proteína do biossurfatante obtido foi determinado pelo método de Biureto (GORNALL *et al.*, 1949)¹¹⁶ e o conteúdo lipídico pelo método de BLIGH & DYER (1959)¹¹⁷.

¹¹⁶ GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 177: 751- 756, 1949.

¹¹⁷ BLIGH, E.C.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917, 1959.

4.6.2 Análise de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos presentes na amostra foi obtida conforme o sistema Pico Tag, utilizando hidrólise ácida e cromatografia líquida de alta eficiência^{118, 119}.

4.6.3 Espectrometria de massa – ESI

Foi utilizado espectrômetro de massa tipo quadrupolo “time-of-flight” (TOF) equipado com ionização por eletrospray (ESI) Micromass Q-ToF 1, gás de dessolvatação (nitrogênio) aquecido a 100°C. As amostras do biossurfatante purificado e de surfactina padrão (Sigma) foram dissolvidas em mistura de acetonitrila/água (1:1 v/v) e 0,01% de ácido fórmico para análise em modo positivo. A injeção foi realizada em fluxo de aplicação contínuo de 15µL/min.

4.6.4 Estudos de estabilidade

Após o cultivo nas condições estabelecidas (30° C, 150 rpm, 1 vvm ar/L meio durante 36h), a espuma recolhida livre de células foi submetida a testes de estabilidade.

4.6.4.1 Estabilidade a pH

O pH do meio de cultivo foi ajustado para valores entre 2 a 14 por adição de NaOH ou HCl 1N. Após 30 minutos a tensão superficial e CMD foram determinadas.

4.6.4.2 Estabilidade a temperatura

O meio fermentado foi aquecido a 100 °C durante 15, 30, 60, 90 e 120 min., a 135 °C durante 15, 30 e 60 min., a 121°C/1atm por 30 min. e sob congelamento a -15°C. Todos os ensaios após o tratamento térmico

¹¹⁸ ELKIN, R. G.; WASYNEZUK, A. M. Amino acid analysis of feedstuffs hydrolysates by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed phase high performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry*, 64 (4): 226 -229, 1987.

¹¹⁹ HAGEN, S.R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. *Journal Association Analysis Chemistry*, 2 (6), 1989.

foram mantidos em repouso até atingir a temperatura ambiente e tiveram a atividade superficial (TS e CMD) observadas.

4.6.4.3 Estabilidade frente à força iônica

O meio adicionado de NaCl em concentrações variando de 1 a 25%, foi avaliado medindo-se posteriormente a tensão superficial e a CMD.

4.6.4.4 Estabilidade à ação enzimática

Foram utilizadas as proteases bromelina, ficina, papaína e tripsina nas concentrações finais 0,1; 1,0 e 10 mg/mL no meio livre de células, que foi misturado por inversão e deixado em repouso por 1 hora. O ensaio foi efetuado em duas etapas, na ausência de ativador cisteína e na presença deste numa concentração de 20 mmol/mL no meio reacional, já que as proteases estudadas são do tipo cisteína-proteases.

Os ensaios foram conduzidos a 30°C.

O estudo em questão visou avaliar o efeito enzimático sobre a estabilidade do biossurfatante, para tanto a tensão superficial e a CMD foram avaliadas.

Em todos os testes de estabilidade a TS e CMD foram determinados conforme 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente.

4.7 Aplicações do biossurfatante

4.7.1 Atividade emulsificante (E₂₄, E₇₂):

Foram utilizados hidrocarbonetos, óleos comestíveis industrializados comuns e derivados de plantas regionais, óleos combustíveis e gorduras para avaliar a capacidade do biossurfatante em formar emulsões estáveis.

Em tubos de ensaio com tampa de rosca foram distribuídos 4 mL de solução aquosa 1mg/mL do biossurfatante, adicionando-se 6 mL de diferentes reagentes a serem testados. Cada tubo foi submetido a

vortex máximo por 2 minutos, deixando-se em repouso por 24 e 72 horas. O índice E_{24} e E_{72} foram determinados medindo-se a altura da camada emulsionada (cm) dividindo-se pela altura total de líquido x 100⁵³.

4.7.2 Potencial para biorremediação

A capacidade de remoção de óleo bruto de areia, foi testada através da saturação de 60g de areia com 5 mL de petróleo (óleo bruto). Porções de 20g da areia contaminada foram colocadas em Erlenmeyer de 250 mL adicionando-se 20 mL de solução aquosa 1mg/mL do biossurfatante bruto. Os frascos foram submetidos a Shaker rotatório a 150 rpm por 24 h, a temperatura ambiente. O experimento sofreu duas lavagens intercaladas de 12 h. O líquido removido de cada lavagem foi observado e a areia retirada do frasco ao final de 24 h foi levada a estufa a 50°C até secagem. Foram avaliados a quantidade de petróleo removido e a limpeza da areia. Um ensaio controle, utilizando 20 mL de água foi utilizado para comparação.

4.7.3 Atividade antimicrobiana

4.7.3.1 Método de difusão em ágar¹²⁰

A atividade antibiótica do biossurfatante pelo método de difusão em ágar foi testada. Uma solução estoque de biossurfatante (20mg/mL) foi preparada utilizando clorofórmio/metanol (65:15 v/v) como diluente: 5, 6,7 e 10 µL da solução, foi aplicada em discos de papel filtro (Whatman 3, diâmetro 0,5 cm) e deixados em dessecador para evaporação do solvente. Os microrganismos utilizados foram isolados, uma colônia foi retirada e dispensada em tubos de diluição, até atingirem a concentração referente a escala nº. 3 de MACFARLAND. A partir desta diluição, foi feito Swab na superfície de placas de Petri com ágar nutriente. Os discos foram colocados na superfície das placas previamente inoculadas com os microrganismos a

¹²⁰ BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedure. In: Manual of Clinical Microbiology. BALOWS, A. ed., American Society for Microbiology, Washington DC., p.1117-1125, 1991.

serem testados. Utilizou-se cepas de *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 6532 e 25923, *Serratia marcescens* ATCC 0710 e 2563, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella cholerae* ATCC 10708, *Rodhococcus effiecence* ATCC 6939 e *Micrococcus luteus* ATCC 4698. A inibição do crescimento foi observada através da medida dos diâmetros dos halos formados ao redor dos discos, após 24 horas de incubação a 30°C. Em todos os ensaios, um disco controle com apenas solvente foi utilizado.

4.7.3.2 Concentração inibitória mínima (MIC)¹²¹

A MIC foi determinada através do método da microdiluição, utilizando-se microplaca contendo 100 µL de caldo MUELLER-HINTON, e 50 µL de solução de concentração conhecida do biossurfatante e diluições seriadas, cada recipiente foi inoculado com 100 µL de uma suspensão de microrganismos de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de MCFARLAND nº 0,5 e diluídos para concentração final de 10⁴ células/mL. As placas foram seladas com parafilme e incubadas por 24 h à 37°C. Após este período são acrescentados 20 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) 0,5%, e a placa re-incubada por 3 horas na referida temperatura. A MIC é definida como a menor concentração do material capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. As cepas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*, foram utilizadas para verificação do efeito inibitório. Foram utilizados para controle, antibióticos cloranfenicol no caso das bactérias e nistatina para *Candida albicans*.

¹²¹ ELOFF, J. N. P. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64: 711-713, 1998.

4.7.4 Atividade antitumoral

Foi avaliada a atividade antitumoral *in vitro* contra as culturas celulares cancerígenas de: ovário (OVCAR), renal (786), próstata (PC03), cólon (HT29), pulmão (NCI460), mama (MCF-7), mama resistente (NCIADR) e melanoma (UACC-62). Todas as culturas são do tipo aderidas, exceto para leucemia onde a cultura utilizada foi suspensão. Para avaliação da atividade antitumoral foi utilizado procedimento conforme SKEHAN *et al.* (1990)¹²² e MONKS *et al.* (1991)¹²³.

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias obtidas de acordo com o procedimento, descontadas de seus respectivos brancos e através da fórmula abaixo, foi determinada a inibição de crescimento (IG) de cada amostra testada.

Se $T > C$ a droga estimulou o crescimento, não apresenta IG.

Se $T \geq T_0$ mas $< C$, a droga será citostática e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$.

Se $T < T_0$ a droga é citocida e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

Sendo que T é a média da absorbância da célula tratada; C é o controle de célula; T₀ é o controle das células no dia da adição das drogas. O resultado obtido será subtraído de 100%, obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento. As amostras serão consideradas ativas quando apresentarem inibição de crescimento maior que 50%.

¹²² SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R.; New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of National Cancer Institute*; 82: 1107-1118, 1990.

¹²³ MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOS, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLF, F. A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*; 83: 757-766, 1991.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização do substrato manipueira

5.1.1. Manipueira F

A manipueira fervida e centrifugada para remoção dos sólidos, dita manipueira F, demonstrou resultados mais significativos na produção de biossurfatante pela cepa utilizada em relação ao mesmo substrato com maior teor de sólidos¹⁰⁹. Na obtenção de tensoativos por culturas de *Bacillus spp.* em efluentes do processamento de batatas com alta concentração de sólidos, THOMPSON e colaboradores(2000)⁹⁶ observaram um rendimento inferior àqueles obtidos no mesmo meio com baixo teor de sólidos.

Neste trabalho, o substrato não recebeu qualquer suplementação na composição ou modificação do pH, cuja média se manteve em 5,3. A alta concentração de carboidratos totais no resíduo (25, 1 g/L), além da presença de matéria orgânica e minerais essenciais ao metabolismo de microrganismos, demonstram que o resíduo é por si só suficiente em termos nutricionais (Tabela 4), tanto para o crescimento, como para a biossíntese de surfatantes^{2, 22}.

A composição química do resíduo manipueira, revela através de sua rica composição química, o potencial de utilização do resíduo como substrato na produção de compostos de interesse biotecnológico e evidência uma tendência atual do mercado em todo o mundo, a utilização de subprodutos que seriam simplesmente descartados no ambiente.

5.1.2 Composição química

A composição química do substrato manipueira foi determinada (Tabela 4). A presença de carboidratos, indica que o metabolismo destas fontes de carbono hidrossolúveis pelo microrganismo *B.*

subtilis LB5a pode ser utilizado, pois este é um comportamento metabólico característico do gênero *Bacillus* na produção de biossurfatantes^{33, 39}.

Os açúcares sacarose, glicose e frutose se encontram presentes na manipueira, o que a classifica como um bom substrato para cultivo de microrganismos, especialmente para produção de biossurfatantes, já que tais substâncias são consideradas as melhores fontes de carbono para a síntese de compostos tensoativos como a surfactina³⁹. Outros autores também determinaram a sacarose como sendo o principal carboidrato presente na manipueira, que além disso também apresentou frutose e glicose^{14, 107}.

Tabela 4- Caracterização química da manipueira F

Composto	Concentração
DQO	60,0 g L ⁻¹
Açúcares totais	34,51 g L ⁻¹
Sacarose	24,5 g L ⁻¹
Glicose	7,6 g L ⁻¹
Frutose	4,2 g L ⁻¹
Matéria orgânica	50,5 g L ⁻¹
Nitrogênio	0,6 g L ⁻¹
Fósforo	161,3 mg L ⁻¹
Potássio	2,9 g L ⁻¹
Cádmio	0,06 mg L ⁻¹
Chumbo	0,01 mg L ⁻¹
Cobre	0,7 mg L ⁻¹
Cromo	0,01 mg L ⁻¹
Níquel	0,8 mg L ⁻¹
Zinco	1,1 mg L ⁻¹
Boro	0,3 mg L ⁻¹
Enxofre	69,0 mg L ⁻¹
Magnésio	366,8 mg L ⁻¹
Mangânes	4,1 mg mL ⁻¹
Ferro	5,6 mg mL ⁻¹
Cálcio	122,8 mg L ⁻¹
Alumínio	8,2 mg L ⁻¹
NH ₄ ⁺	36,2 mg L ⁻¹
NO ₃ ⁻	5,2 mg L ⁻¹
pH	5,3

Segundo SHEPPARD & MULLIGAN (1987)¹¹⁴, a composição do meio de cultura tem uma importância crítica na determinação do rendimento e nas propriedades dos biossurfatantes produzidos. As

altas concentrações de carboidratos e sais minerais essenciais ao cultivo de microrganismos encontram-se no efluente, demonstrando sua potencialidade como meio de cultura alternativo para produção destes compostos. Os sais minerais principalmente ferro e manganês, são considerados fatores importantes na produção de surfatantes por *Bacillus sp.*⁴⁴. Tais componentes também se encontram na manipueira. Outros nutrientes que afetam a produção de biossurfatantes incluem nitrogênios, fosfatos e íons metálicos¹.

Sabendo-se que a fonte de nitrogênio é essencial à biossíntese de compostos tensoativos⁴², a manipueira F foi suplementada com extrato de levedura, peptona, uréia e nitrato de amônio, além de fontes alternativas milhocina e soro de leite. Não houve incremento significativo na quantidade de produto bruto, exceto quando se utilizou peptona bruta na concentração 10 g/L, onde foi observado um rendimento de 3,2 g/L de surfatante bruto. Entretanto, a precipitação ácida evidenciou um produto com aspecto muito escuro e de difícil solubilidade, exigindo mais etapas na extração e purificação, ou seja imprimindo um maior custo ao processo. Além disso, dados de TS e CMDs muito similares àqueles obtidos na manipueira sem suplemento, nos desencorajaram de investir mais esforços neste sentido, já que o incremento de 22% pode se tratar de impurezas.

O conteúdo de matéria orgânica, assim como o índice de nutrientes requeridos no cultivo de microrganismos evidencia a manipueira como excelente meio de cultivo, esses dados nos conduziram à continuidade da otimização do processo utilizando a manipueira sem qualquer suplementação, visando portanto um procedimento simplificado e um menor custo no processo produtivo.

A presença de metais pesados (Ni, Cd, Pb, Cu e Cr, entre outros) pode ter origem na própria composição química dos solos. Uma vez que, segundo a resolução nº 20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 18/06/1986, nenhum dos metais contidos na Tabela 4 exibiu concentrações acima do permitido¹²⁴.

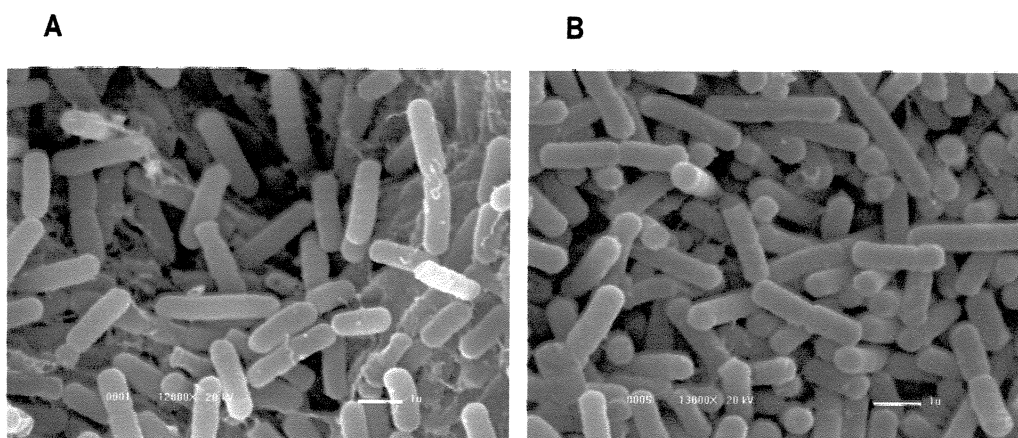
¹²⁴ VON SPERLING, Introdução à qualidade das águas e tratamento de esgotos, 2ª ed, Vol. 1. SEGRAC: Belo Horizonte, 44 – 45, 1996.

5.2 Microrganismo

O *Bacillus* sp. LB5a foi previamente selecionado em trabalhos anteriores^{108, 109} desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica de Alimentos pelo nosso grupo de pesquisas, como microrganismo potencial na produção de biossurfatante.

Baseado na premissa de que a produção de biossurfatantes está associada ao crescimento celular⁹⁴, a padronização do inóculo foi utilizada, e o tempo de 8 horas em meio caldo nutriente foi definido, sendo este o período de incubação que apresentou densidade óptica de 0,480 nm. e maior número de células viáveis $5,9 \times 10^8$ UFC/mL.

A aquisição de imagens do microrganismo por microscopia eletrônica de varredura em diferentes meios e tempos de cultivo (Figura 6), revelou suas características morfológicas. A ausência de modificações estruturais significativas frente às condições utilizadas foi observado. A Figura 6C, evidencia um material amorfo presente em toda a amostra avaliada, possivelmente devido à presença de amido e/ou outros componentes do resíduo que seriam consumidos pelo microrganismo ao longo do processo fermentativo, já que em tempos superiores (24 e 36 hs.) o mesmo cultivo não apresenta tais características. Além disso, apenas algumas células em bipartição são observadas.



Placa A. Nu 24 h, aumento 12.000 x

C. Nu 8 h, aumento 12.000 x

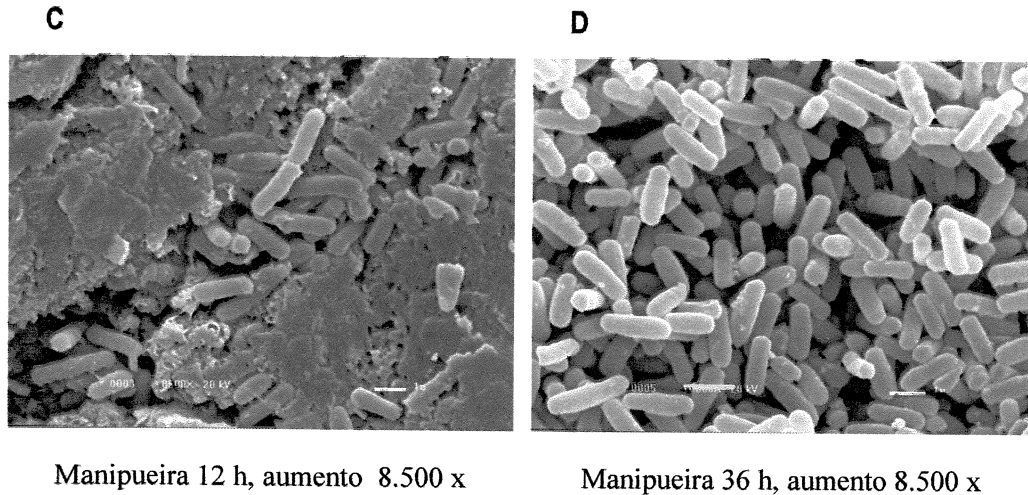


Figura 6 - Fotografia em microscópio de varredura do microrganismo LB5a em diferentes condições. **A)** Cultivo em ágar nutriente (A. Nu) 30°C/24 h; **B)** Cultivo em caldo nutriente 30°C/8 h a 150 rpm; **C)** Cultivo em meio manipueira F 30°C / 8 horas 150 rpm , 1vvm ar/L meio e **D)** Cultivo em manipueira F 36 horas mesma condição.

5.3 Cinética de Produção

A cinética de produção de biossurfatante do *B. subtilis* LB5a, mostrado nos Gráficos 1, 2, e 3, evidenciam o crescimento do microrganismo, evolução do pH, atividade superficial, consumo de carboidratos e produção de biossurfatante, durante 84 horas de cultivo no substrato manipueira F.

A maior produção do biossurfatante 2,5 g/L se deu após 36 horas de fermentação, enquanto o crescimento do microrganismo atingiu o máximo em 24 horas e se manteve constante até 36 horas, culminando com a produção máxima. A partir de 36 horas, o número de células viáveis decai suavemente até o final da fermentação, caracterizando o período de morte celular (Gráfico 1).

A produção de surfatante pelo *B. subtilis* LB5a ocorreu predominantemente durante as fases exponencial e estacionária de crescimento do cultivo, em contraste com a maioria dos metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*, cuja síntese ocorre predominantemente na fase pós-exponencial

quando ocorre a exaustão de um ou mais nutrientes essenciais⁹⁴. Desempenho similar foi descrito por alguns autores, quando utilizaram o gênero *Bacillus* spp.^{72, 94, 125}.

O meio de cultivo estéril, (tempo 0) apresentou tensão superficial de 47,74 mN/m, este parâmetro foi reduzido gradativamente com a produção de tensoativos pela cultura, atingindo um valor mínimo de 25,96 mN/m em 36 horas de fermentação. Os valores de diluições micelares (CMD⁻¹ e CMD⁻²), onde houve uma diluição do meio de cultivo da ordem de 10 e 100 vezes respectivamente, são próximos a 30 mN/m, se mantendo constante até o final da fermentação, mostrando que a concentração de surfatante no meio já a partir de 24 horas é bastante significativa. O valor de tensão interfacial da água em hexadecano como fase leve da mistura foi de 49,0 mN/m, enquanto que com o meio livre de células foi de 0,76 mN/m, demonstrando a elevada capacidade do tensoativo em reduzir tanto a tensão superficial quanto a interfacial. Os valores de tensão superficial e interfacial de um bom tensoativo devem ser menores que 30 e 1 mN/m, respectivamente⁷, valores coerentes aos obtidos, até mesmo para os dados de CMD, o que potencializa a efetividade do surfatante obtido nesse processo.

DAVIS *et al.* (1999)⁴² relataram a manutenção dos níveis de surfactina no meio de cultura de *B. subtilis* 21332, mesmo com o esgotamento de nutrientes. A queda drástica, observada na concentração de biossurfatante após 72 horas (Gráfico1), se deve ao recolhimento do surfatante, por um sistema de exaustão, que auxilia no processo de extração e purificação do produto, já que praticamente todo o biossurfatante permanece na espuma, diminuindo perdas e permitindo a remoção ininterrupta do mesmo.

¹²⁵ KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J. and ECKART, K.; Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332; Febs Letters; 231 (1): 107 - 110, 1988.

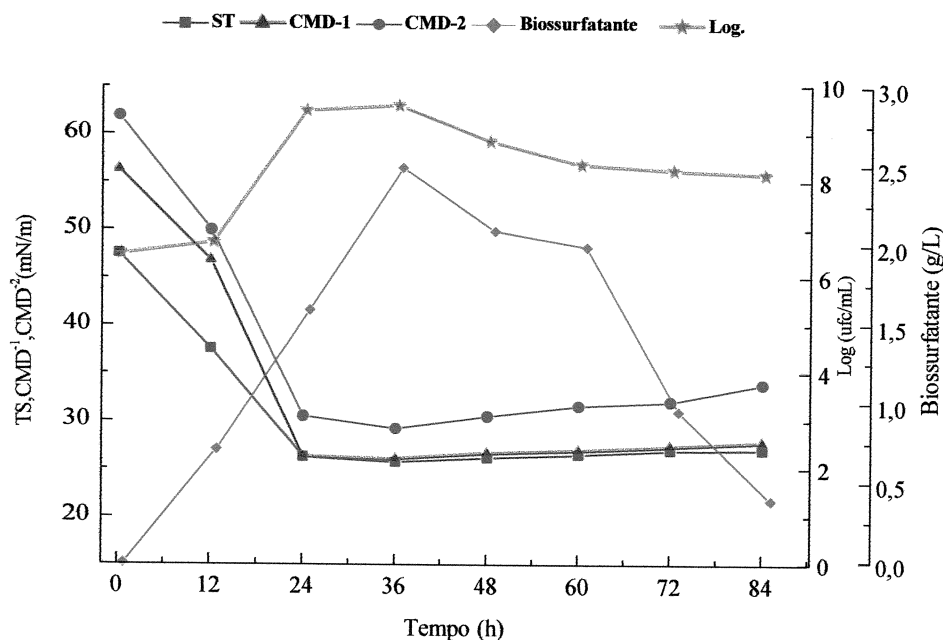


Gráfico 1- Cinética de produção de biossurfatante pelo *B. subtilis* LB5a em manipueira utilizando fermentador de bancada

A formação de espuma ocorre à medida em que o biossurfatante é sintetizado, culminando com a expulsão desta a partir de 18 horas de fermentação, o material coletado em kitassato (Figura 7) é liquefeito naturalmente e os dados de atividade superficial (Gráfico 1) são oriundos do meio assim obtido. Em média 650 mL de espuma colapsada são obtidos a partir de 1,5 L de manipueira, nas condições estabelecidas.

Uma vez removido o surfatante da cuba de fermentação, o meio contido em seu interior tem sua atividade superficial aumentada progressivamente, alcançando valor de 44,62 mN/m após 36 horas de fermentação. Se comparadas as tensões superficiais do meio estéril (47,74 mN/m), meio do interior da cuba após remoção da espuma (44,62 mN/m) e meio obtido a partir da espuma liquefeita (25,96 mN/m), percebe-se que houve a retirada efetiva do tensoativo pelo sistema de exaustão e que uma quantidade pouco significativa de biossurfatante pode ainda conter no meio fermentado, já que há uma diferença de tensão superficial, porém as etapas posteriores, inviabilizam a recuperação do produto remanescente.

COOPER *et al* (1981)⁴⁴, DAVIS *et al.* (2001)¹²⁶ e NOAH *et al.* (2002)¹²⁷ utilizaram-se de um sistema similar para obtenção de surfactina de *B. subtilis*, cujos resultados são em média 3,0 g/L e 1,67 g/L em meio mineral e 2,8 g/L em efluente do processamento de batatas, respectivamente.

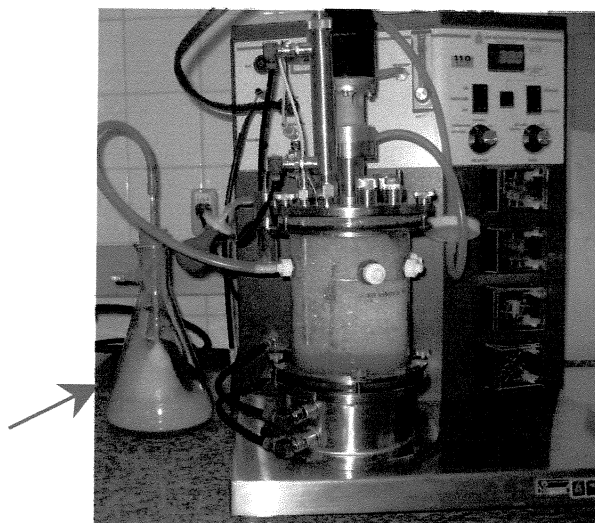


Figura 7 - Fermentador de bancada em funcionamento. A seta destaca a espuma coletada em Kitassato, indicativo de produção de tensoativos pelo Bacilo LB5a.

Quando a fermentação foi conduzida sem o sistema de exaustão, ou seja, sem captação da espuma, o rendimento apresentado foi muito inferior, obteve-se 0,9 g/L de surfatante bruto. A remoção do surfatante parece estimular a produção do mesmo. A técnica de fracionamento da espuma, além de impedir a ocorrência de retroinibição⁴⁴, oferece a vantagem da retirada de surfatante, sem perda significativa de biomassa, e permite economia no processo produtivo, já que implica na concentração do produto¹²⁶.

A determinação de açúcares totais e redutores (Gráfico 3), revelam o consumo desta fonte de carbono predominantemente no início do cultivo. Ao final da produção os níveis de carboidratos ficaram em

¹²⁶ DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 346 - 354, **2001**.

¹²⁷ NOAH, K. S.; FOX, S. L.; BRUHN, D.F., THOMPSON, D. N. and BALA, G. A.; Development os continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in airlift reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology*; V: 98-100, 805 - 813, **2002**.

torno de 8% do total de carboidratos presentes inicialmente. O consumo de aproximadamente 50 % carboidratos (Gráfico 2 e 3), durante as primeiras 36 horas de fermentação, contrastam com o aumento progressivo da produção de biossurfatante neste mesmo período, concordando com a produtividade associada ao crescimento da cultura e a utilização do substrato ^{59, 60, 128}.

De forma geral, durante a biossíntese do composto, o pH do meio apresentou tendência crescente, porém, a partir de 24 horas não houve variação expressiva neste parâmetro. O pH do meio tem um importante papel na produção de biossurfatantes assim como nas propriedades apresentadas por essas moléculas^{59, 65}. Modificações no pH da manipueira, variando entre 4,5 a 8,0 por adição de HCl ou NaOH (0,1 mol/L) não causaram diferença significativa no rendimento do surfatante, porém a composição do produto em condições diferentes ao pH natural do resíduo (5,3) não foi avaliada.

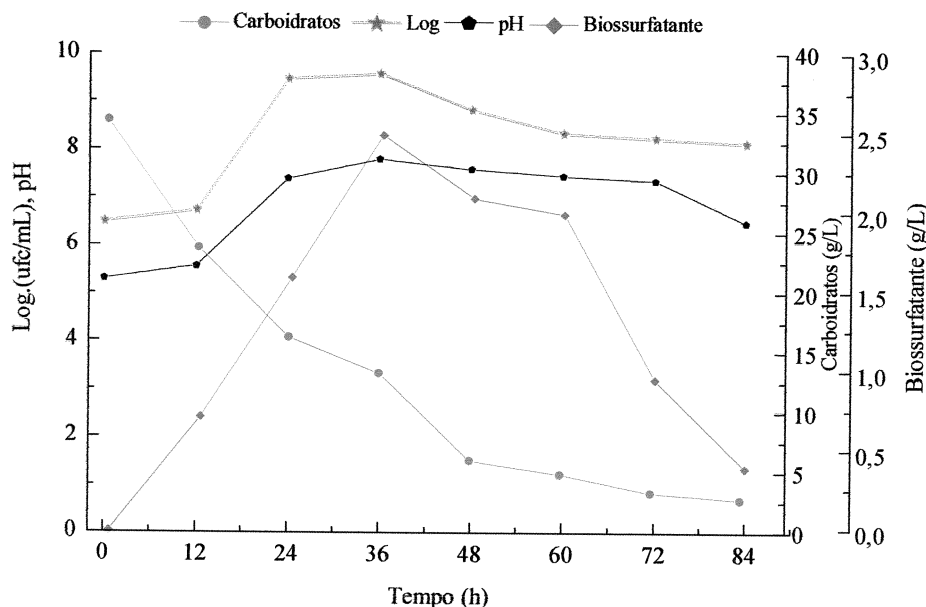


Gráfico 2 - Cinética de produção de biossurfatante pelo *B. subtilis* LB5a em manipueira utilizando fermentador de bancada

¹²⁸ KIM, H.S.; YOON, B.D.; LEE, C.H.; SUH, H.H; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. Journal of Fermentation and Bioengineering, 84 (1): 41- 46, 1997.

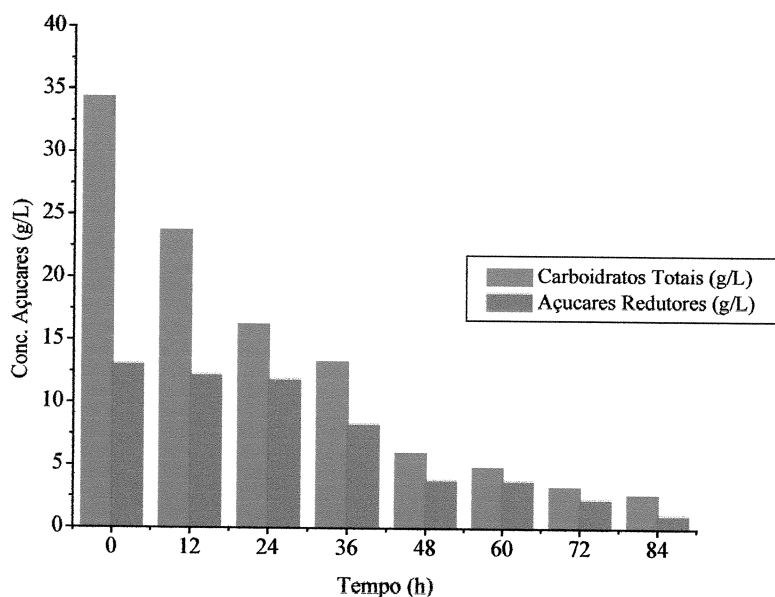


Gráfico 3 - Consumo de carboidratos pelo *B. subtilis* LB5a durante o cultivo em fermentador de bancada

A concentração micelar crítica (CMC) do meio (espuma) de produção manipueira, isento de células resultou em uma CMC^{-1} de 120, dado coerente ao obtido em fermentação utilizando agitador rotativo no mesmo meio, com CMC^{-1} de 90¹⁴. O surfatante obtido por fracionamento da espuma está mais concentrado no meio, logo requer uma diluição maior para atingir a CMC. Um valor máximo de 70 para CMC^{-1} , em substrato alternativo foi relatado⁹⁶, enquanto que em meio sintético observou - se CMC^{-1} variando de 20 a 40⁴⁴. A CMC do biossurfatante bruto, a partir de uma solução de 1 mg/mL, foi determinada em 10 mg/L conforme o Gráfico 4. KIM *et al* (2000)²⁶ descreveram CMC de 20 mg/L para um biossurfatante produzido em meio sintético e FOX e BALA (2000)⁷⁴ obtiveram para meios contendo resíduo de batata, CMCs de 2.9, 0.15, 0.10 a 0.16 e 0.23 g/L para os meios com diferentes teores de sólidos.

O parâmetro CMC é fundamental na determinação da eficiência de qualquer tensoativo, esta determinação é dada pela concentração de surfatante necessária para reduzir significativamente a tensão superficial de um meio. Quanto menor a CMC, mais eficiente é o surfatante. Segundo MULLIGAN & GIBBS (1993)¹⁶, a CMC dos biossurfatantes mais vigorosos varia entre 1 - 2000 mg/L. Os resultados mostrados

indicam que o produto obtido da fermentação de *B.subtilis* LB5a em manipueira, apresenta características surfatantes ideais.

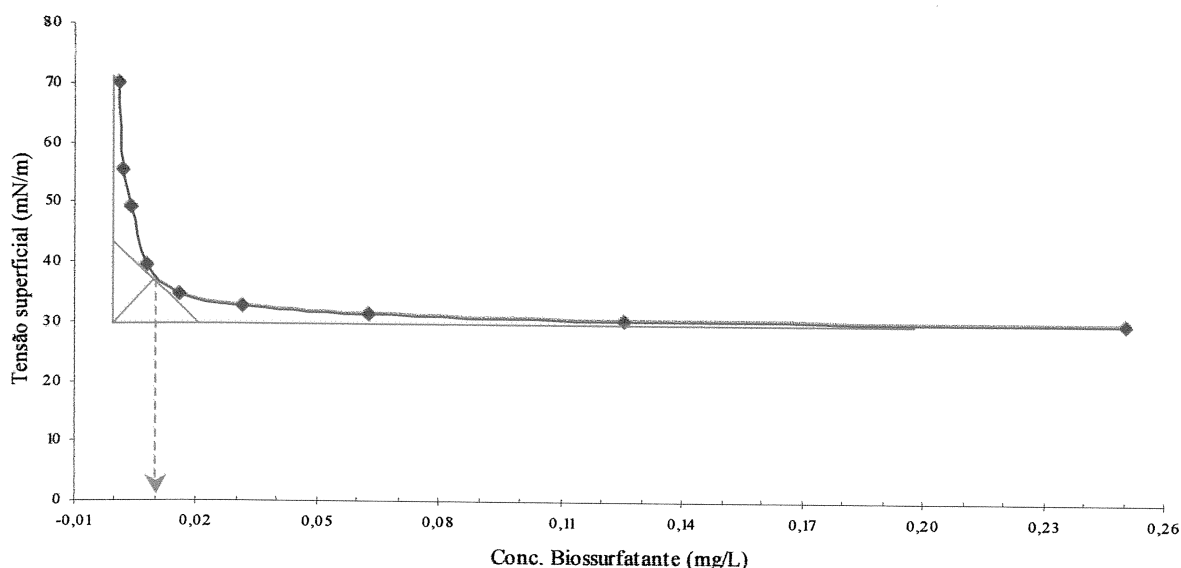


Gráfico 4 - Determinação da CMC através de diluições sucessivas de uma solução 1 mg/mL de biossurfatante bruto

Os resultados obtidos revelam a manipueira e a cultura LB5a, ambos, objetos de investigação do nosso grupo, como promissores focos de pesquisa, uma vez que aliam, utilização de subprodutos, economia no processo de produção e alta produtividade.

A obtenção do biossurfatante com produção de 2,5 g/L em 36 horas de cultivo, são encorajadores e merecem especial atenção. Utilizando manipueira, NITSCHKE e PASTORE (2004)⁸⁰, produziram 3,0 g/L de surfactante em 48 horas de fermentação, resultados similares aos obtidos por THOMPSON *et al.* (2000)⁹⁶, que observaram uma concentração máxima de 3,6 g/L em resíduo de batata com baixo teor de sólidos. Já para meio suplementado com melaço, MAKKAR & CAMEOTRA, (1997)⁷³ obtiveram entre 0,4 - 1,0 g/L, os mesmos autores relataram bons resultados utilizando água de turfa. Resultados relevantes têm

sido obtidos com a utilização de óleos minerais^{25, 64}, resíduos de destilaria e soro de leite⁹⁵ além de outros materiais de baixo custo⁹⁸ envolvendo grande variedade de microrganismos e tipos de biossurfatantes.

5.4 Caracterização do biossurfatante

5.4.1 Estabilidade a pH, temperatura, força iônica e ação enzimática

A estabilidade do biossurfatante foi avaliada em diferentes condições, quanto à manutenção da atividade superficial, utilizando-se os parâmetros, tensão superficial (TS) e diluição micelar crítica (CMD-¹ e CMD-²), para o meio de cultivo livre de células.

A preservação da estabilidade sob condições adversas é um importante atributo para as substâncias tensoativas, pois a maioria das áreas de aplicações onde são utilizados, requerem um comportamento constante e manutenção da eficiência do produto.

O efeito do tratamento térmico em diferentes intervalos de tempo, não afetou significativamente a estabilidade do tensoativo. Submetido a 100°C, a tensão superficial e CMDs se mantiveram sem alterações significativas em tempo superior a 2 horas. A 135°C por uma hora (Gráfico 5), condição na qual apenas a CMD-² teve pequena variação, porém, a tensão superficial ainda se manteve inferior a 30 mN/m. O meio suportou temperaturas de esterilização (121°C) por 30 minutos e temperatura de congelamento (-18°C) por 18 meses, com a manutenção da atividade superficial. Tratamento térmico superior a 135°C não foi avaliado devido à limitação de equipamentos utilizados.

Alterações de pH (Gráfico 6) levaram a variações de tensão nos intervalos de 2 a 5 e superior a 12; sendo que na faixa de 6 a 12, os parâmetros se mantiveram estáveis. Nota-se uma ligeira variação para a CMD-², mas não ultrapassando 30 mN/m, característica considerada essencial para um bom surfatante. Para valores de pH inferiores a 5, ocorre a precipitação do biossurfatante no meio, resultando no aumento da tensão superficial devido à insolubilidade do mesmo nessa condição. Em pH superior a 12 houve um aumento substancial na TS, e CMDs, sobretudo na CMD-².

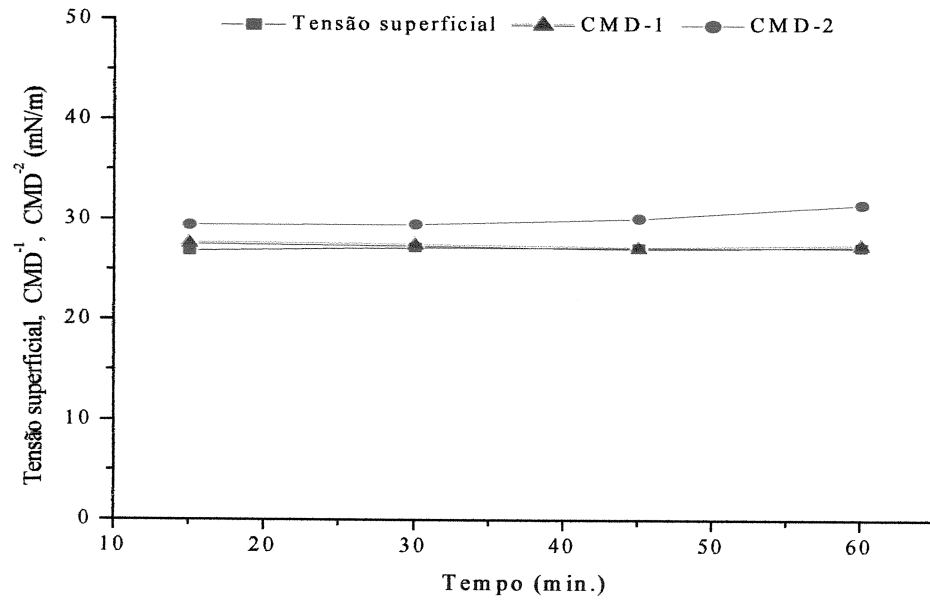


Gráfico 5 - Efeito da temperatura (135°C) sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira.

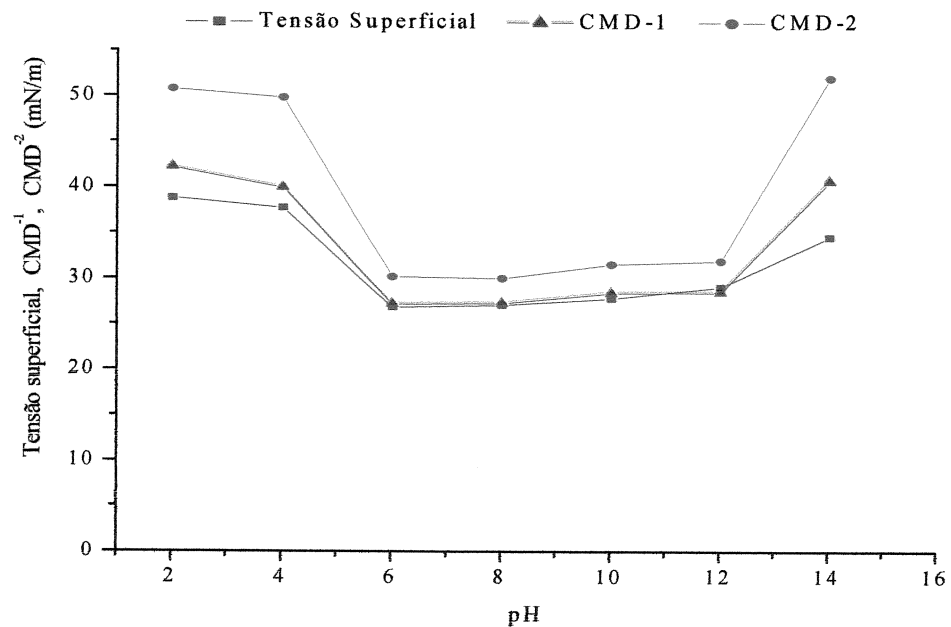


Gráfico 6 - Efeito da ação do pH sobre a atividade superficial do surfatante produzido pelo *B. subtilis* LB5a em manipueira.

A adição de cloreto de sódio ao meio (Gráfico 7), evidenciou uma constância na tensão superficial com até 15% de NaCl. A CMD-1 não apresentou modificações consideráveis em todas as concentrações, enquanto que estreitas alterações de estabilidade foram observadas na CMD-2. Concentração de sal superior a 15%, promoveu alteração na tensão superficial de forma mais abrupta se comparada às CMDs, uma vez que nestes parâmetros a diluição do meio minimiza o efeito salino.

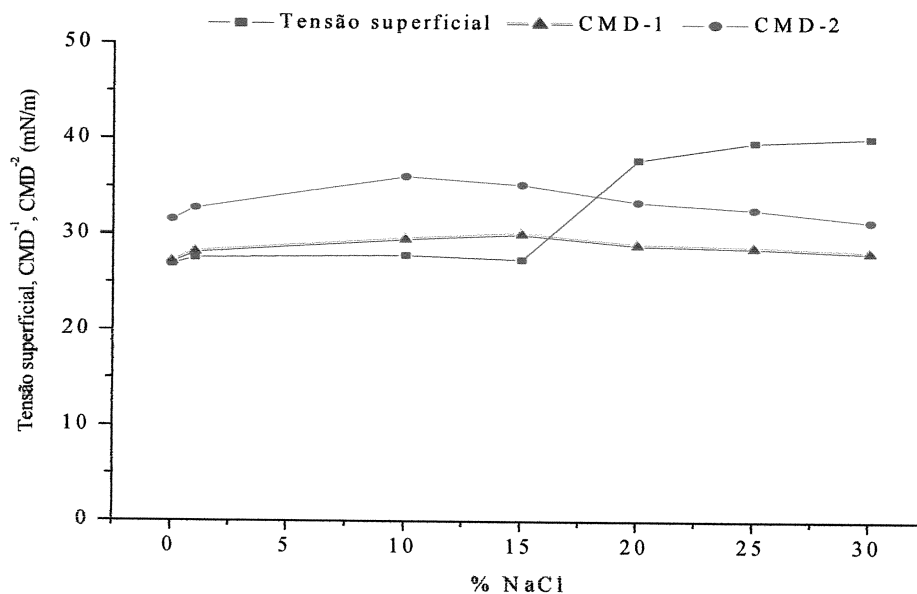


Gráfico 7- Efeito da ação de diferentes concentrações salinas sobre a atividade superficial do surfatante produzido pelo *B. subtilis* LB5a em manipueira.

Utilizando meio sintético em cultura de *Bacillus*, HOROWITZ *et al.* (1990)³ obtiveram um biossurfatante BL86, resistente a temperaturas de 20° a 120°C por 20 minutos e a uma escala de pH de 5 a > 13 e também estável a concentrações de 0 a 30% de NaCl. KIM *et al.* (1997)¹²⁸ relataram a estabilidade do tensoativo C9-BS de *Bacillus subtilis*, a temperatura de 100°C por uma hora, pH de 5 a 9,5 e a concentração de sais de 1,0 mM para NaCl e 10 mM para CaCl₂. MAKKAR & CAMEOTRA (1999)¹¹⁵ obtiveram biossurfatante, resistente a pH na faixa de 4,5 a 10, com pequena variação na tensão superficial e CMD; sob temperatura de ebulição por 2 horas o surfatante não apresentou variação de estabilidade.

NITSCHKE e PASTORE¹⁴ também observaram estabilidade de surfactinas produzida em frascos agitados, cujos resultados corroboram com os dados obtidos para a produção em fermentador de bancada.

O surfatante obtido a partir do microrganismo LB5a em manipueira, apresentou comportamento de estabilidade similares aos relatados, e portanto, contem as características necessárias para utilização em biorremediação e recuperação melhorada de petróleo, cuja aplicação requer a manutenção da atividade superficial frente a condições adversas⁴.

A adição de enzimas sobre a atividade do biossurfatante, não revelou nenhuma alteração considerável para quaisquer das enzimas utilizadas (Tabela 5). A adição de ativador cisteína às soluções enzimáticas, já que tais enzimas são cisteína protease, também não afetou a atividade tensoativa nas três concentrações utilizadas. Os dados obtidos em todos os testes envolvendo o tratamento enzimático revelaram a estabilidade do biossurfatante, pois se assemelham aos mesmos parâmetros do ensaio controle.

Tabela 5- Ação das enzimas ficina, bromelina, papaína e tripsina e diferentes concentrações sobre a atividade superficial do biossurfatante de *B. subtilis* LB5a em manipueira.

Concentração (mg/mL)	Bromelina			Ficina			Papaína			Tripsina		
Com ativador												
	TS	CMD ⁻¹	CMD ⁻²	TS	CMD ⁻¹	CMD ⁻²	TS	CMD ⁻¹	CMD ⁻²	TS	CMD ⁻¹	CMD ⁻²
*Controle	25,90	26,03	29,72	25,90	26,03	29,72	25,90	26,03	29,72	25,90	26,03	29,72
0,1	26,13	27,31	30,45	26,08	27,08	30,15	26,0	26,98	30,40	26,28	27,29	30,41
1,0	26,09	27,0	30,18	26,18	26,99	30,44	26,15	27,02	30,29	26,31	27,16	30,36
10,0	26,24	27,02	30,19	26,23	27,01	30,41	26,17	27,10	30,33	26,42	27,19	30,31
Sem ativador												
*Controle	25,90	26,03	29,72	25,90	26,03	29,72	25,90	26,03	29,72	25,90	26,03	29,72
0,1	26,01	27,42	30,04	26,16	27,56	29,89	26,05	27,07	30,43	26,39	27,11	30,28
1,0	26,15	26,96	30,0	26,13	27,32	30,58	26,09	27,13	30,19	26,38	27,05	30,19
10,0	26,45	27,04	29,85	27,0	27,40	30,19	26,19	27,43	30,73	26,52	27,26	30,23

* No ensaio controle o meio de cultivo sem adição de enzimas foi utilizado.

Alguns surfatantes sofrem facilmente ação enzimática e em consequência disso perdem as propriedades de emulsificação. Emulsan, um biossurfatante de *A. calcoaceticus*, não é utilizado como emulsificante no transporte de óleo bruto, pelo fato de poder ser hidrolisado¹²⁹.

Perda da conformação inicial e consequentemente das propriedades tensoativas por ação enzimática, foi relatado pioneiramente por GRANGERMARD e PEYPOUX (1999)¹³⁰, que averiguaram a ação de uma endoprotease V8 de *S. aureus*, hidrolisando o lipopeptídeo cíclico surfactina. Além disso, NITSCHKE e colaboradores(2004)³⁷, observaram a ação de uma protease e as alterações causadas por esta nas propriedades superficiais de surfactina de *B. subtilis* ATCC 21332 em meio manipuladora.

A excelente capacidade de reduzir a tensão superficial, baixa CMC, e estabilidade a condições extremas de pH, temperatura, força iônica e a ação enzimática, sugerem a possibilidade do uso do biossurfatante produzido em manipuladora pela bactéria LB5a, em aplicações comerciais. Particularmente, a alta estabilidade frente a ampla faixa de pH, temperaturas elevadas e alta concentração de sais, indicam que o produto é apropriado para o uso na indústria petrolífera, em aplicações ambientais como na biorremediação e como agente desnaturante na recuperação ambientes contaminados.

5.4.2 Caracterização química

A composição de aminoácidos indicou a presença de ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina, na proporção 1:1:1:4, o que conduz à caracterização do composto como sendo um heptapeptídeo. A análise de aminoácidos revelou a presença dos aminoácidos citados e apenas traços de alguns outros aminoácidos.

A determinação do conteúdo protéico e lipídico do produto purificado, revelou uma proporção de, praticamente 1:1; o que pode ser um indício da categoria de surfatantes a que deve pertencer o produto

¹²⁹ ROCHA, J. M. S.; Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia, Boletim de biotecnologia; 5 - 11, 2002.

¹³⁰ GRANGEMARD, I.; WALLACH, J.; PEYPOUX, F. Evidence of surfactin hydrolysis by a bacterial endoprotease. Biotechnology Letters, 21: 241 - 244, 1999.

em análise, já que a presença de cadeia peptídica e de ácidos graxos, é característica de uma só classe de biossurfatantes, os lipopeptídeos, a proporção dos componentes também pode indicar a pureza da amostra.

Um biossurfatante de *B. subtilis* cultivado em um meio de sais minerais, foi caracterizado e mostrou um conteúdo lipídico de 17,08% e protéico de 13,3%, a determinação de aminoácidos do produto purificado, revelou-se idêntica aos dados obtidos pela cepa LB5a em substrato manipuladora¹¹⁵.

Os pesos moleculares de vários compostos surfatantes foram determinados por espectrometria de massas (EM), sendo que a intensidade relativa dos íons, representa a composição percentual de cada molécula nas amostras analisadas. A similaridade do perfil de espectrogramas referente a amostra e ao padrão confirmam os dados até então obtidos (Figuras 8 (padrão) e 9 (amostra)), e atesta a presença e a caracterização estrutural de surfactinas em manipuladora.

O lipopeptídeo surfactina também conhecido como subtilisina ou serolisina, cuja estrutura é composta por uma cadeia de ácidos graxos (C₁₂ a C₁₇), unida por ligações do tipo β-hidróxi, a uma sequência de aminoácidos em cadeia fechada, característico de anéis lactônicos¹³⁰, é produzido por cepas de *Bacillus subtilis*; foi pioneiramente reportado por ARIMA *et al* em 1968¹³, e alvo de frequentes investigações. O composto se caracteriza pela presença de isoformas que se diferenciam pela presença de um grupamento metílico (CH₃) adicionado a cada um dos homólogos^{76, 133, 131, 132}, ou ainda pela substituição do aminoácido de posição 4, valina, por alanina, leucina ou isoleucina e/ou ainda, a substituição do sétimo aminoácido, leucina por valina ou isoleucina¹³².

¹³¹ OKA, K.; HIRANO, T.; HOMMA, M.; ISHII, H.; MURAKAMI, K.; MOGAMI, S.; MOTIZUKI, A.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Satisfactory separation and MS-MS spectrometry of six surfactins isolated from *Bacillus subtilis* nato. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 41: 1000 -1002, 1993.

¹³² KOWALL, M., J. VATER, B. KLUGE, T. STEIN, P. FRANKE, AND D. ZIESSOW. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB105. J. Colloid Interface Science. 204:1 - 8. 1998.

No padrão analisado observa-se claramente a presença de 20 sinais relativos aos homólogos de surfactina¹³³. Os sinais m/z em 994,2, 1008,2, 1022,2 e 1036,3 revelam a presença dos homólogos protonados $[M+H]^+$, as espécies (m/z 1016,3 1030,2, 1044,3 e 1058,3) são adutos de sódio ($PM = 23$)* $[M+Na]^+$ e potássio ($PM = 39$)* $[M+K]^+$, para m/z 1031,2, 1046,3, 1060,3 e 1074,3, os demais sinais podem constituir as isoformas duplamente protonadas.

As moléculas de massa 1036,6, 1044,6 e 1058,6 foram predominantes na amostra de biossurfatante (Figura 9), sendo que a forma mais abundante foi a de m/z 1058,6, correspondente a surfactina de peso molecular 1035, em cuja composição tem-se um heptapeptídeo, uma cadeia lipídica contendo 15 carbonos, juntamente com um íon Na^+ ; além deste sinal, a molécula 1036,6 aparece na amostra na sua forma protonada (H^+) e adicionada do íon $K^+ = 1074,7$. A presença dos adutos de sódio e potássio predominam na amostra, enquanto que as espécies protonadas aparecem em menor intensidade, dado similar ao obtido por KOUMOUTSI *et al.*(2004)¹³⁴. Os padrões de fragmentação dos íons de surfactina padrão em ESI-MS/MS foram idênticos aos observados para o produto obtido da fermentação em manipueira.

Em trabalho anterior utilizando manipueira como meio de cultivo, NITSCHKE e PASTORE (2004)¹⁴ obtiveram surfactinas, cujo perfil cromatográfico dado por espectrometria de massas, foi muito similar aos aqui observados diferenciando apenas para as isoformas adicionadas de sódio e potássio que são mais abundantes neste trabalho.

¹³³ KAKINUMA, A.; HORI, M.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33:971 - 997, 1969.

¹³⁴ KOUMOUTSI, A.; CHEN, X.; HENNE, A.; LIESENGANG, H.; HITZEROTH, G.; FRANKE, P.; VATER, J.; BORRISS, R.; Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloquelaciens* strain FZB42, *Journal of Bacteriology*, 186 (4):1084 - 1096, 2004.

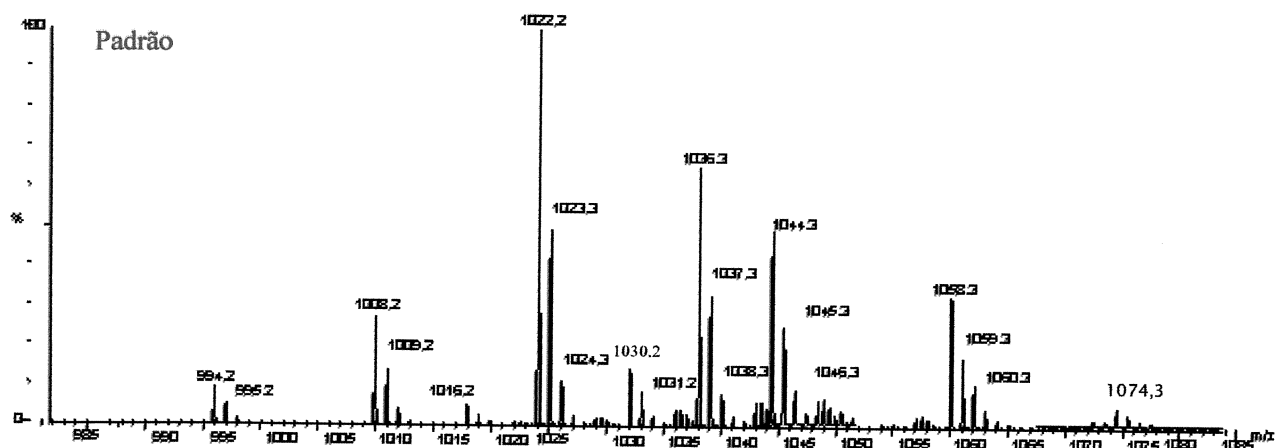


Figura 8. Espectro de massa (EM) da surfactina padrão, os diferentes sinais de m/z, são diferenciados pela presença de (A) surfactina + próton, (B) surfactina + sódio e C) surfactina + potássio.

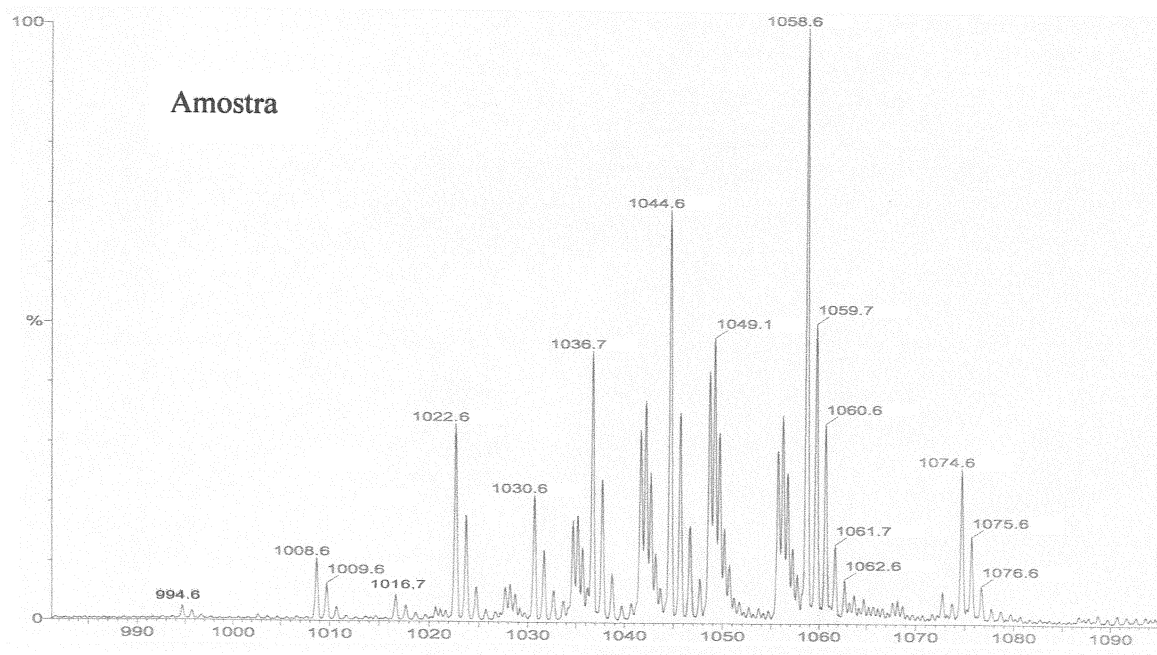


Figura 9- Espectro de massa (EM) da amostra de surfactina, os diferentes sinais de m/z, são diferenciados pela presença de (A) surfactina + próton, (B) surfactina + sódio e C) surfactina + potássio.

*As formas protonadas Na^+ e K^+ se agregam às moléculas devido a presença de sais no meio utilizado para solubilizar as amostras.

A Tabela 6 contém um resumo dos sinais principais da amostra analisada, e as características inerentes a cada uma das isoformas do surfatante obtido.

Tabela 6 - Principais homólogos do biossurfatante surfactina, obtido de *B. subtilis* LB5a em manipueira, analisados por espectrometria de massas.

Sinais principais (m/z)	Homólogo
994,6	C ₁₂ surfactina [M+H] ⁺
1008,6	C ₁₃ surfactina [M+H] ⁺
1016,7	C ₁₂ surfactina [M+Na] ⁺
1022,6	C ₁₄ surfactina [M+H] ⁺
1030,6	C ₁₃ surfactina [M+Na] ⁺
1036,7	C ₁₅ surfactina [M+H] ⁺
1044,6	C ₁₄ surfactina [M+Na] ⁺
1049,1	C ₁₃ surfactina [M+K] ⁺
1058,6	C ₁₅ surfactina [M+Na] ⁺
1060,6	C ₁₄ surfactina [M+K] ⁺
1074,6	C ₁₅ surfactina [M+K] ⁺

Confirmada a estrutura e estabilidade do tensoativo, este foi utilizado para avaliar o potencial envolvendo aplicações possíveis para indústrias de petróleo, alimentícia, cosmética e farmacológica.

5.5 Aplicações

5.5.1 Capacidade emulsificante

A capacidade de estabilizar emulsões é um parâmetro também utilizado para averiguar a atividade superficial de surfatantes⁶⁰. Além disso, substâncias que apresentam essa capacidade apresentam importância relevante na composição de produtos cosméticos, alimentícios e ainda como detergentes ou agentes de limpeza.

A formação de emulsões foi determinada pelos índices E₂₄ e E₇₂, utilizando uma solução 1 mg/mL de produto bruto. O biossurfatante se mostrou capaz de formar emulsões estáveis (Figura 10) em óleos de buriti (*Mauritia flexuosa*), maracujá (*Passiflora alata*), cupuaçu (*Theobroma grandiflora*), babaçu (*Attalea speciosa*), linhaça (*Linum usitatissimum*), castanha do Pará (*Bertholetia excelsa*), andiroba (*Carapa guianensis*), palma (*Elaeis guineensis dura*), soja (*Glycine max*), girassol (*Helianthus annus*), canola

(*Brassica napus*) e óleo de oliva (*Olea europaea*). Todos apresentaram alto índice de emulsificação (Gráfico 8), variando de 66 a 94,3%. O mesmo procedimento foi aplicado para hidrocarbonetos e combustíveis (Figura 11), observando resultados também muito expressivos, com índice de 69,8 a 90,4% de emulsificação (Gráfico 9), exceto para óleo diesel que emulsionou em 38,5%, e a emulsão se desestabilizou a partir de 60 horas em repouso.

Utilizando hidrocarbonetos e biossurfatante de *B. subtilis* em resíduos agroindustriais, NITSCHKE e PASTORE⁸⁰, obtiveram emulsões estáveis do tipo A/O com índices de emulsificação de 60 a 80%. HABA *et al.* (2003)¹³⁵, produziram e aplicaram rhamnolípideos de *Pseudomonas sp.*, na obtenção de emulsões estáveis com óleos de linhaça, amêndoa, mineral, óleo bruto, e querosene. ABU-RUWAIDA *et al.* (1991)⁶⁰, obtiveram resultados similares para hidrocarbonetos e alguns combustíveis na determinação de E₂₄, sendo que os óleos combustíveis formaram emulsões do tipo água em óleo. KAPLAN & ROSENBERG (1982)¹³⁶, relataram maior atividade emulsificante de um biossurfatante de *Torulopsis petrophilum* contra hidrocarbonetos de cadeia curta, se comparado aos de cadeia longa.

O biossurfatante produzido pelo *B. subtilis* LB5a, não revelou especificidade quanto ao tamanho da cadeia carbônica, já que altos teores de emulsão estáveis foram encontrados, tanto para os hidrocarbonetos quanto para os óleos, independentemente da extensão da cadeia (Tabela 7). Além disso, observa-se a formação de emulsões tanto do tipo óleo em água como água em óleo, o que permite o emprego do biossurfatante em diversas áreas, dependendo dos componentes utilizados.

Na indústria de alimentos, bioemulsificantes são utilizados em molhos para salada⁷³, em panificação e produtos cárneos. A capacidade de emulsionar óleos comestíveis, indica a indústria de alimentos como uma proeminente área de aplicação para o biossurfatante; os resultados alcançados

¹³⁵ HABA, E.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R.; MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044, *Biotechnology and Bioengineering*, 81 (3): 316 - 322, 2003.

¹³⁶ KAPLAN, N.; ROSENBERG, E.; Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production in *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Applied Environmental Microbiology*, 41: 1335 -1341, 1982.

também apontam o uso do tensoativo como componente de cosméticos e produtos de higiene. Devido a baixa toxicidade, excelente propriedade umectante e compatibilidade com a pele, os biossurfatantes tem encontrado nos produtos de higiene e uso pessoal, um nicho de mercado promissor⁷³.

Tabela 7 - Óleos e porcentagens de composição dos ácidos graxos principais

Óleos	Composição de ácidos-graxos*
Buriti	C _{18:1} (73 - 78%) e C _{16:0} (17 - 19%)
Maracujá	C _{18:2} (62%) e C _{18:1} (20%)
Cupuaçu	C _{18:1} (39 - 47%) e C _{18:0} (22 - 35%)
Babaçu	C _{12:0} (40 - 55%), C _{14:0} (11 - 27%) e C _{16:0} (5 - 11%)
Linhaça	C _{18:3} (52 - 54%), C _{18:1} (20%) e C _{18:2} (17%)
Castanha do Pará	C _{18:1} (29 - 48%), C _{18:1} (30 - 47%) e C _{16:0} (14 - 16%)
Andiroba	C _{18:1} (49%), C _{16:0} (27%) e C _{18:2} (16%)
Palma	C _{18:1} (30 - 56%) e C _{16:0} (19 - 55%)
Soja	C _{18:2} (50 - 57%), C _{18:1} (18 - 29%) e C _{16:0} (13%)
Girassol	C _{18:2} (48 - 74%), C _{18:1} (13 - 40%) e C _{18:0} (7%)
Canola	C _{18:1} (60 - 73%) e C _{18:2} (14- 23%)
Óleo de oliva	C _{18:1} (55 - 83%), C _{18:2} (3,5 - 21%) e C _{16:0} (7,5 - 20%)

* FIRESTONE (1999)¹³⁷, CANTO e colaboradores (1980)¹³⁸



Figura 10 - Emulsões (E₇₂) de solução (1mg/mL) de biossurfatante de *B. subtilis* LB5a frente a diferentes óleos: (da esquerda para direita) cupuaçu, linhaça, soja, canola, buriti, andiroba, palma, girassol, oliva, babaçu, maracujá e castanha do Pará

¹³⁷ FIRESTONE, D.; Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes; U.S FDA, Washington, AOCS Press, 1999.

¹³⁸ CANTO, W.; MEDINA, J.; GARCIA, J. L. M.; Frutas tropicais, N°9, Maracujá; ITAL, Campinas - SP, 1980.

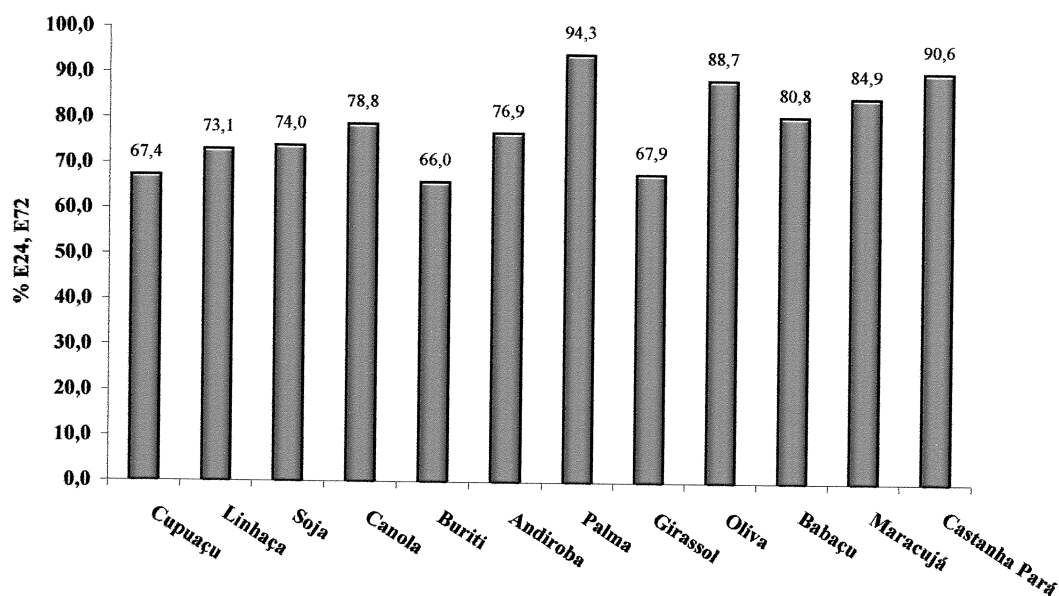


Gráfico 8 - Índice de emulsificação obtido para diferentes óleos utilizando uma solução (1mg/mL) do biossurfatante de *B. subtilis* LB5a em meio manipuladora

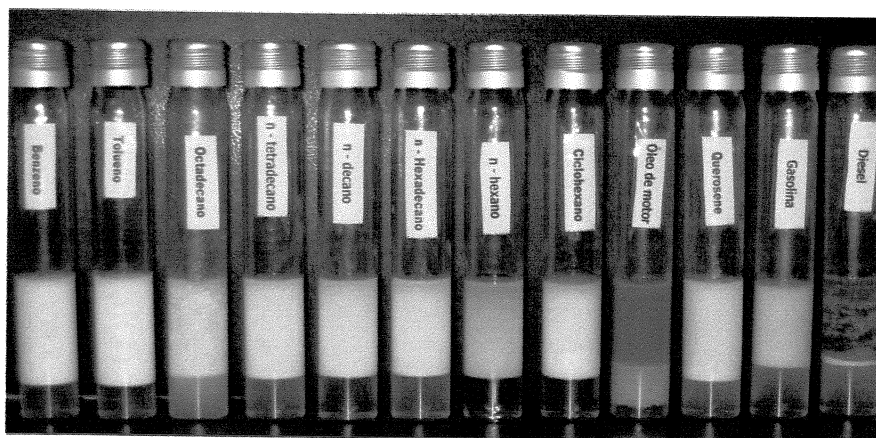


Figura 11- Emulsões (E_{72}) de solução (1mg/mL) de biossurfatante de *B. subtilis* LB5a frente a diferentes hidrocarbonetos e combustíveis: (da esquerda para direita) benzeno, tolueno, octadecano, tetradecano, decano, hexadecano, ciclohexano, óleo de motor, gasolina, diesel.

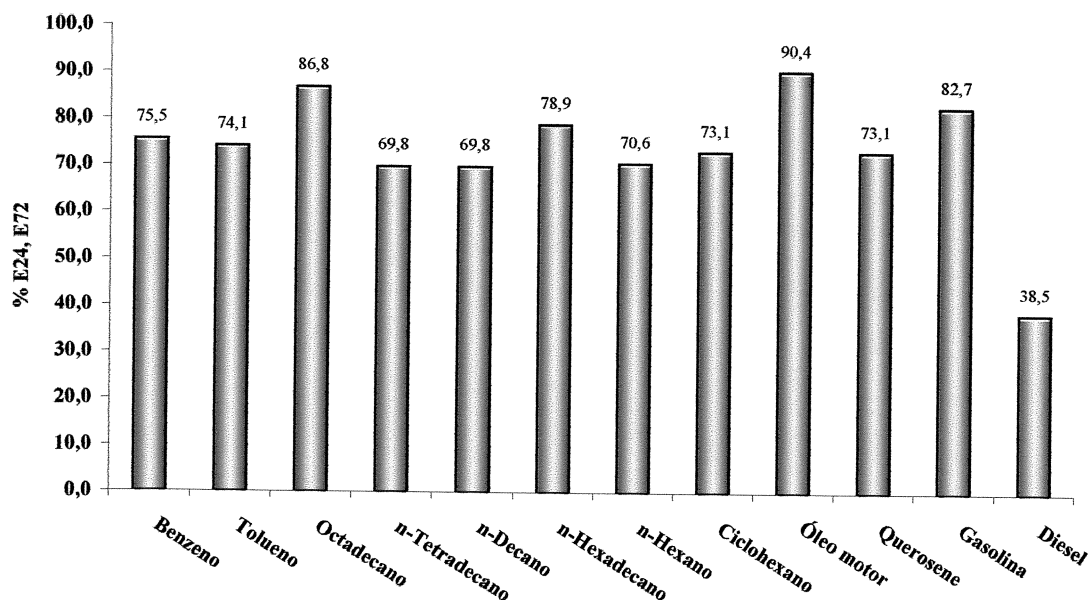


Gráfico 9 - Índice de emulsificação obtido para diferentes hidrocarbonetos e combustíveis, utilizando uma solução (1mg/mL) do biossurfatante de *B. subtilis* LB5a em meio manipulada

Os índices E₂₄ e E₇₂, não apresentaram diferenças superior a 2% entre si.

5.5.2 Biossurfatante de *B. subtilis* LB5a em biorremediação

Bilhões de toneladas de petróleo são produzidos por ano no mundo, e 0,08 a 0,4% do total desta produção pode eventualmente poluir os oceanos. Óleos brutos contêm produtos mutagênicos, carcinogênicos e inibidores de crescimento, que causam efeitos tóxicos severos aos organismos marinhos, estima-se que a poluição terrestre de mesma origem seja igual a do ambiente marinho⁷⁹. Atualmente, compostos capazes de contribuir minimizando os impactos ambientais deste nível, são pesquisados e muito valorizados.

O uso da surfactina de *B. subtilis* LB5a em biorremediação foi estudado, utilizando uma solução de concentração 1 mg/mL do biossurfatante bruto em areia impregnada com petróleo, simulando um ambiente contaminado. As Figuras 12 e 13 ilustram a capacidade de remoção do óleo bruto da areia, resultando na retirada de praticamente todo o contaminante, o aspecto muito mais claro da areia tratada

com o tensoativo e da limpeza dos recipientes utilizados no teste, mostram a efetividade do biossurfatante na remoção do contaminante. VAN DYKE *et al.* (1991)⁷⁹ relataram que um biossurfatante de *P. aeruginosa* SB30, foi capaz de dispersar óleo em finas camadas, o que facilita a remoção do contaminante de areias.

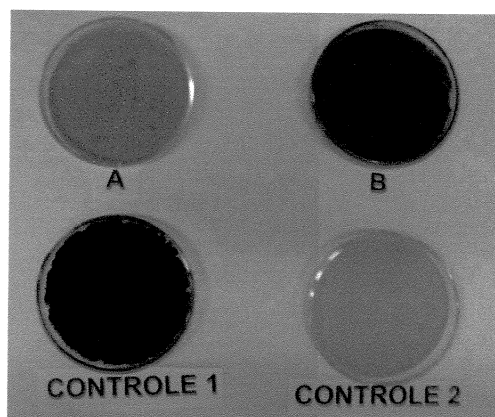


Figura 12 - Placas contendo o material utilizado no teste de biorremediação, A) Areia lavada com surfactina de *B. subtilis* LB5a, B) Areia lavada com água, Controle 1) areia impregnada com petróleo e controle 2) areia limpa

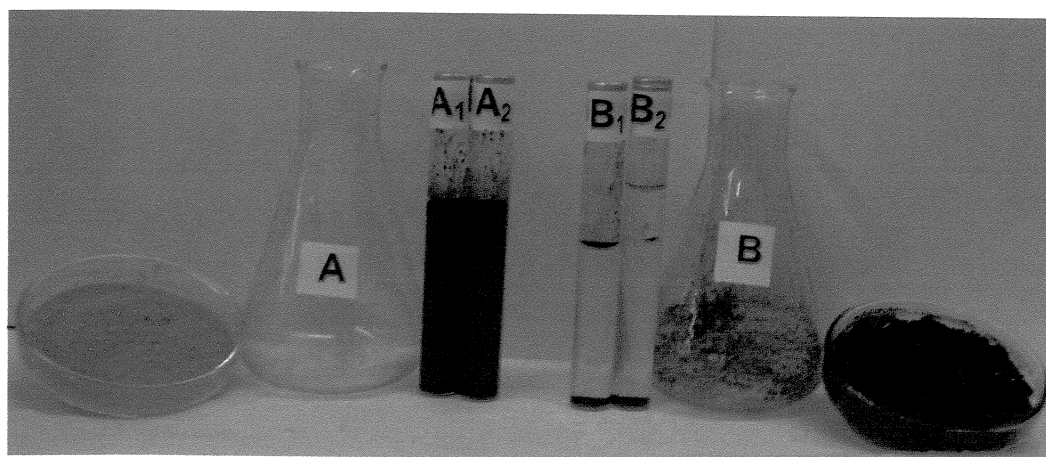


Figura 13 - Material utilizado no teste de biorremediação: A) Areia lavada com solução de surfactina de *B. subtilis* LB5a, Erlenmeyer utilizado para agitação e água de lavagens após 12 (A₁) e 24 (A₂) horas; B) Areia lavada com água, Erlenmeyer utilizado para agitação e água de lavagens após 12 (B₁) e 24 (B₂) hs.

Para determinadas indústrias, como as petrolíferas, por exemplo, o interesse na remoção do óleo de ambientes contaminados ou a captação do óleo bruto de regiões adversas é uma meta constante, torna-se interessante tanto a separação do petróleo do material (areia ou rochas) onde ele está aderido,

como o fracionamento do produto recuperado, permitindo a retirada posterior de água ou outros contaminante presentes e envolvidos no processo. Para avaliar o possível resgate do petróleo do meio contendo petróleo + solução surfatante (Figura 13 A₁, A₂), a quebra da emulsão foi verificada (Figura 14), e resultados interessantes, foram obtidos.

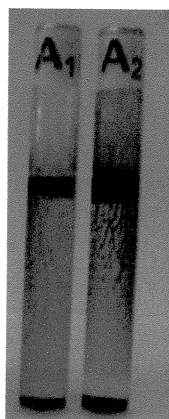


Figura 14 - Quebra da emulsão formada no teste de biorremediação, por efeito da adição de 0,5% (p/p) de CaCl_2

A quebra da emulsão por ação do eletrólito CaCl_2 , acrescenta um resultado importante na recuperação de petróleo, o produto separado da solução aquosa pode ser facilmente recolhido, o que minimiza custos com a concentração do material de interesse. A separação quase que completa em 2 fases, água e petróleo é relevante e mostra a possibilidade de recuperação de um componente de interesse a partir de uma emulsão.

Visando recuperar petróleo de areia contaminada, ABU-RUWAIDA *et al.* (1991)⁶⁰ observaram alta porcentagem de recuperação de óleo, utilizando surfatantes sintéticos e biossurfatante ST- 5. MAKKAR e CAMEOTRA (1999)^{69, 73, 115} relataram a recuperação de 56 e 62% de óleo em testes com areia contaminada por ação de surfatante de *B. subtilis* MTCC1427 e MTCC2423. O mesmo produto apresentou 90% de emulsificação (E_{24}) em óleo Diesel. Os autores indicaram o produto para ser usado na indústria de petróleo, para limpeza de sedimentos em tanques de estocagem. Um estudo avaliou a eficiência de

remoção de fenantreno e diesel de solo contaminado, e mostrou a remoção de 70% e 60% de recuperação, respectivamente¹³⁹.

5.5.3 Atividade antibiótica

A atividade antibiótica da surfactina de *B. subtilis* foi verificada pelo método de difusão em ágar, e revelou ser um potencial inibidor do crescimento microbiano. Os resultados preliminares de atividade inibitória, apresentada para microrganismos de difícil controle, como a cepa de *P. aeruginosa*, cultivos de *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, cepas envolvidas em infecções e toxinfecções alimentares e ainda *S. marcescens* e *M. luteus*, nos incentivaram a continuidade da verificação da sensibilidade destes e de outros microrganismos, a fim de determinar a concentração mínima do tensoativo, necessária à inibição do crescimento microbiano.

O ensaio quantitativo evidenciou a ação da surfactina para todas as cepas testadas (Tabela 8), confirmando a susceptibilidade das cepas já evidenciadas pelo método do disco, acrescidas de *S. choteraesuis*, *E. faecium*, *B. subtilis* e *C. albicans*. Embora, apenas *E. faecium* e *M. luteus* tenham apresentado atividade em concentrações inferiores a 1mg/mL, o lipopeptídeo surfactina é reconhecidamente um poderoso antibiótico^{73, 78} e a obtenção do mesmo em meio alternativo possibilita uma drástica redução dos custos uma vez que o processo de produção envolve a utilização de resíduos e técnicas simples de extração e purificação.

A separação dos homólogos da surfactina e a observação do comportamento antimicrobiano de cada uma das diferentes moléculas, pode ser um novo foco de pesquisas, visando maximizar o espectro e eficiência de ação do composto produzido em manipueira pelo microrganismo *B. subtilis* LB5a.

¹³⁹ SHIN, K. and KIM, K. W.; A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenantrene and diesel in sand. *Environmental Geochemistry and Health*; 26: 5 - 11, 2004.

Tabela 8 - Microrganismos envolvidos no teste de inibição quantitativo da concentração inibitória mínima

Microrganismos	Amostras MIC mg/mL	
	Padrão*	surfactina
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,004	>1,0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0,004	>1,0
<i>Enterococcus faecium</i>	0,004	0,8
<i>Bacillus subtilis</i>	0,004	>1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,125	>1,0
<i>Escherichia coli</i>	0,030	>1,0
<i>Serratia marcescens</i>	0,004	>1,0
<i>Bacillus cereus</i>	0,002	>1,0
<i>Candida albicans</i>	0,002	>1,0
<i>Micrococcus luteus</i>	0,004	0,25

*Nistatina para *C. albicans* e Clorafenicol para as demais bactérias

Um lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis*, reportado por JENNY *et al.* (1991)¹⁴⁰, apresentou atividade antibiótica contra algumas culturas de leveduras e bactérias Gram negativas, *P. aeruginosa* e *E. coli* em concentração mínima de 1 mg/mL. YAKIMOV *et al.* (1995)¹⁴¹ relataram ação antimicrobiana superior de surfactina, se comparada a liquenisina, para testes em discos. Em cultivos da *Bacillus sp.*, THIMON *et al.* (1995)⁹¹, descreveram a ação antifúngica de biosurfatante iturina e relacionou o seu modo de ação com a alteração da morfologia e estrutura das células. Para a atividade antiviral, VOLLENBROICH *et al.* (1997)¹⁴² atribuiu as interações físico-químicas entre o surfatante e a membrana lipídica do vírus, como responsáveis pela morte do vírus. NITSCHKE e colaboradores (2004)³⁷ relacionaram a atividade

¹⁴⁰ JENNY, K.; KAPPELLI, O.; FIECHTER, A.; Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: Structural analysis and characterization; Applied Microbiology Biotechnology, 36: 5 - 13, 1991.

¹⁴¹ YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H.L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus liqueniformis* BAS50. Applied and Environmental Microbiology, 61(5): 1706-1713, 1995.

¹⁴² VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R. M. PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. Biological, 25: 289-297, 1997.

antiviral de surfactina, não somente com a presença do envelope viral mas também com a composição do mesmo.

A atividade antibiótica de surfactante produzido em resíduo, abre uma nova perspectiva acerca da obtenção do composto surfactina e outros biossurfatantes, e amplia a possibilidade de modificações estruturais nestas moléculas visando sobretudo maximizar a eficiência de aplicações em variadas áreas. A produção em manipueira fornece dados para um processo de produção viável economicamente, se comparada à utilização de substratos sintéticos.

5.5.4 Atividade anticancerígena

Quanto à atividade antiproliferativa, a surfactina inibiu de maneira concentração-dependente todas as linhagens avaliadas, porém não se observou nenhuma seletividade (Gráfico 10). A atividade da surfactina provavelmente está relacionada à sua capacidade de lesionar a membrana celular, desestruturando a bicamada lipídica. HAFERBURG *et al.* (1986)³³ propuseram o mecanismo baseado na capacidade de interpolação do biossurfatante, atingindo o interior da célula e promovendo a ruptura da parede plasmática. Outros autores também associam a atividade antibiótica e antitumoral destes compostos com a ruptura de membranas^{36, 142, 143}. Esta propriedade pode explicar a falta de seletividade quanto à atividade antiproliferativa da surfactina, uma vez que toda célula apresenta uma membrana celular e esta bioestrutura é de fundamental importância para a manutenção e divisão celular.

A ação da surfactina sobre bactérias pertencentes aos gêneros *Mycoplasma* e *Mycobacterium*, cujas células possuem respectivamente, membrana e parede celular rica em lipídeos, conduziram à hipótese de que a ação antimicrobiana da surfactina e dos lipopeptídeos cíclicos em geral, estaria relacionada à interação da molécula com a membrana celular^{142, 143}.

¹⁴³ ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin. US patent 3.687.926; 29 aug. 1972.

Investigando as atividades biológicas de um biossurfatante de *C. antarctica* T- 34, ISODA *et al.* (1997), citado por BANAT *et al.* (2000)⁸²⁷⁸, descreveram a indução da diferenciação celular em células de leucemia promielocítica humana (linhagem HL60). Estes glicolípideos também provocaram a diferenciação de células de leucemia mielogênica (linhagem K562) e de leucemia basofílica (linhagem Ku812) em monócitos, granulócitos e megacariócitos. O mesmo trabalho faz referência a KAMEDA *et al.* (1974), quanto a ação antitumoral de surfactina em carcinomas Ehrlich's ascite.

Em concentrações que variaram de 0,25 a 25 µg/mL do tensoativo surfactina produzido em manipueira, observou uma atividade citostática para todas as linhagens de células estudadas enquanto que na concentração de 250 µg/mL observou-se uma atividade citotóxica.

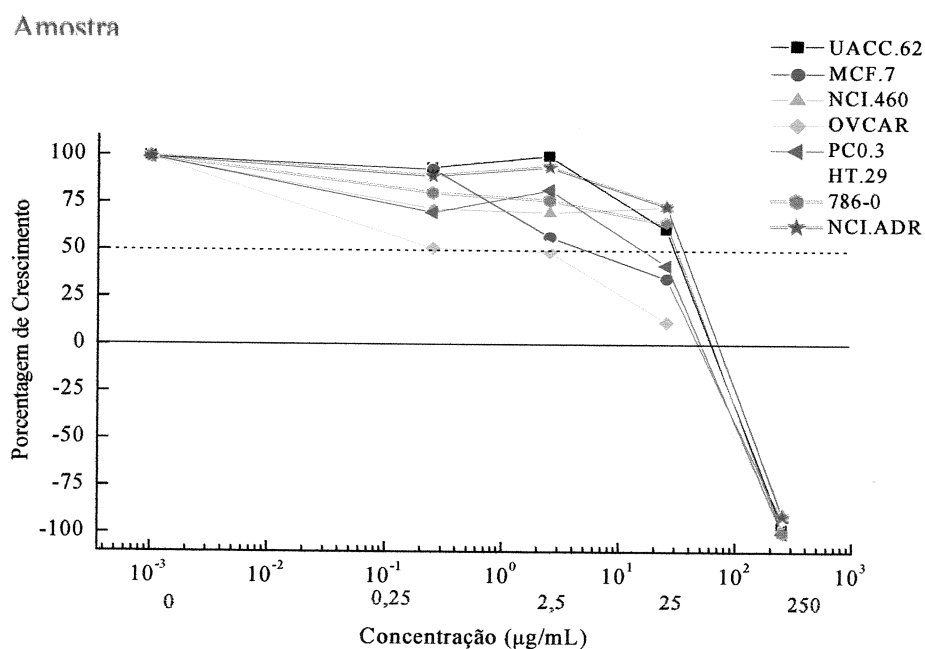


Gráfico 10 - Porcentagem de crescimento de células de câncer humano [ovário (OVCAR), renal (786-6), próstata (PC03), cólon (HT29), pulmão (NCI460), mama (MCF-7), mama resistente (NCIADR) e melanoma (UACC-62)] após 48 h na presença de diferentes concentrações da surfactina. Os valores positivos em relação ao eixo y correspondem à atividade citostática enquanto os valores negativos à atividade citotóxica da surfactina. Os dados obtidos são referentes a um experimento representativo e amostras em triplicata.

Nossos resultados demonstram claramente que a surfactina apresenta atividade antiproliferativa sobre células tumorais humanas. Esta classe de compostos representa uma entrada para o desenvolvimento de novas drogas que possam atuar na inibição do crescimento celular, em especial para células tumorais, porém investigações mais aprofundadas, possivelmente, metodologia de purificação mais específica como o uso de cromatografia líquida de alta eficiência ou modificação estrutural do produto, merecem ser investigados.

As aplicações do biossurfatante surfactina incluem seu uso como emulsificante, espessante e estabilizador de espuma¹. SINGH & CAMEOTRA (2004)³⁴ citam propriedades biológicas pelas quais a surfactina de *B. subtilis* é responsável : a) inibição da formação de coágulos, b) capacidade de induzir a formação de canais nas bicamadas de membranas lipídicas, c) inibição do ciclo da adenosina monofosfato, d) inibição da fosfolipase A₂ e, e) atividade antimicrobiana, antiviral e antitumoral. Ainda é utilizada para aplicações ambientais que vão desde a recuperação melhorada de petróleo e biorremediação até o uso como sequestrante de metais pesados e biodegradação¹⁴⁴.

Os benefícios do uso do tensoativo surfactina nestes e em outros campos é emergente, especialmente em produtos do tipo "health care" e agentes terapêuticos. Entretanto, apesar de suas propriedades tensoativas e biológicas e do grande potencial das aplicações, ainda não é explorado comercialmente, devido principalmente aos altos custos de produção, associado ao baixo rendimento.

A demanda por novos produtos químicos nas indústrias agrícolas, cosméticas, farmacêuticas, de alimentos e na área de conservação ambiental vem crescendo nos últimos anos, e requer da biotecnologia uma atenção especial no sentido de produzir compostos de interesse a custos reduzidos. Esta possibilidade envolve, sobretudo, a utilização de resíduos e aplicação de tecnologias visando aumentar o

¹⁴⁴ MULLIGAN, C. N.; Environmental application for biosurfactants; Environmental Pollution, 133: 183-198, 2005.

rendimento da obtenção de biomoléculas de interesse e finalmente, a disponibilização comercial viável destes compostos.

6 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- ❑ A produção de biossurfatante pelo *B.subtilis* LB5a cultivada em manipueira, resultou na obtenção de 2,5 g/L do biossurfatante surfactina, após 36 horas de fermentação, utilizando fermentador de bancada.
- ❑ O biossurfatante apresentou capacidade de reduzir a tensão superficial do meio de cultivo, de 47,74 mN/m, para 25,96 mN/m, com CMD⁻¹ e CMD⁻² de 26,19 e 29,47 mN/m, respectivamente, e tensão interfacial contra hexadecano de 0,76 mN/m, além de CMC de 10 mg/mL.
- ❑ O composto apresentou estabilidade a altas concentrações salinas (15%), elevadas temperaturas (135°C/ 1 hora), foi estável a ampla faixa de pH (6-12) e apresentou estabilidade frente a variadas concentrações das enzimas ficina, tripsina, papaína e bromelina.
- ❑ A análise de aminoácidos revelou a presença de ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina na proporção 1:1:1:4, portanto, um peptídeo com 7 aminoácidos.
- ❑ Foi confirmada por espectrometria de massas, a presença dos homólogos do heptapeptídeo surfactina com preponderância da isoforma 1036.
- ❑ O produto revelou capacidade de formar emulsões estáveis em óleos, hidrocarbonetos e alguns combustíveis, com índices de emulsificação variando de 60 a 95%, exceto para óleo Diesel que apresentou menor teor.
- ❑ Apresentou potencial para utilização na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) e em biorremediação, avaliado a partir da remoção de óleo bruto de areias contaminadas, com resultados bastante significativos. Permitiu a quebra da emulsão formada na recuperação de petróleo da areia, a partir da adição de CaCl₂, resultado interessante para o emprego na indústria petrolífera.

□ Embora os testes biológicos tenham mostrado ação antimicrobiana inferior as descritas na literatura, o biossurfatante apresentou ação antiproliferativa significativa sobre células tumorais humanas.

De posse dos dados e resultados inerentes à produção do lipopeptídeo surfactina em manipueira, novas oportunidades para estudos de aplicação sistemáticos também surgem com os resultados obtidos no presente trabalho. O efeito da adição de fontes de nitrogênio, já iniciado poderia ser investigado, observando sobretudo as possíveis modificações estruturais e relacionando sua efetividade de aplicação aos custos adicionados ao processo de obtenção.

O efeito da ação antimicrobiana e antitumoral poderiam ser investigados mais profundamente, mediante ensaios envolvendo cada uma das isoformas da surfactina previamente separadas.

Biossurfatantes atuam induzindo a diferenciação celular e compostos que podem induzir esta diferenciação acabam por inibir a progressão de tumores, logo a utilização da surfactina especialmente para a linhagem de ovário (OVCAR) em estudos observando esse efeito indutivo seria bastante interessante.

Além disso, o melhoramento da cepa via engenharia genética é uma alternativa interessante, que pode aumentar a produção e ou reduzir o tempo de fermentação, otimizando o processo de produção, no sentido de minimizar custos e viabilizar a produção do tensoativo em maior escala.

Modificações estruturais via enzimática e estudos das propriedades do biossurfatante modificado podem resultar em um composto com maior atividade.

A associação do produto com outros compostos produzidos no laboratório de Bioquímica e Bioaromas/ FEA - Unicamp como por exemplo, as lipases, buscando maximizar a ação de uma ou ambas as substâncias, pode ser um alvo promissor de investigações.

Os resultados descritos neste trabalho fornecem dados adicionais e relevantes acerca da produção de biossurfatantes utilizando resíduos como substratos.