

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

**ESTUDO DA RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO
DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis***

MARIO CEZAR RODRIGUES MANO
Engenheiro de Alimentos

Prof^a Dr^a GLÁUCIA MARIA PASTORE
Orientadora

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

Contato: (18) 3324-1622; mariomanola@gmail.com

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M317e Mano, Mario Cezar Rodrigues
Estudo da recuperação, concentração e purificação de
biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* / Mario Cezar
Rodrigues Mano. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Biossurfactantes. 2. Processos. 3. Ultrafiltração. 4.
Purificação. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.

Titulo em ingles: Study of recovery, concentration and purification process in a
Bacillus subtilis biosurfactant

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biosurfactant, Process, Ultrafiltration,
Purification

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore
Francisco Maugeri Filho
Gabriela Alves Macedo
Yong Kun Park

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dissertação de mestrado aprovada e defendida em 13 de fevereiro de 2008, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
DCA/FEA/Unicamp
Orientadora

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
DEA/FEA/Unicamp

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
DCA/FEA/Unicamp

Prof. Dr. Yong Kun Park
DCA/FEA/Unicamp

Quando surge um problema, você tem duas alternativas:

ou fica se lamentando, ou procura uma solução.

Nunca devemos esmorecer diante das dificuldades.

Os fracos se intimidam. Os fortes abrem as portas e acendem as luzes.

Dalai Lama

GALILEU E O TEMPO

Em certa ocasião alguém perguntou a Galileu Galilei:

- Quantos anos tens?!

- Oito ou dez, respondeu Galileu, em evidente contradição com sua barba branca.

E logo explicou:

- Tenho, na verdade, os anos que me restam de vida, porque os já vividos não os tenho mais, como não temos mais as moedas que já gastamos.

Crescemos em sabedoria se valorizarmos o tempo como Galileu Galilei.

Dizemos espantados:

- Como passa o tempo!!

Mas na verdade, somos nós que passamos.

O astrônomo italiano sabia que estamos aqui de passagem. Somos peregrinos e é bom pensar na meta que nos espera. A certeza de que o nosso caminhar terreno tem um final,

é o melhor recurso para valorizarmos mais cada minuto que percorremos. Assim podemos aproveitar o que realmente temos: O PRESENTE.

Convém desfrutar cada dia como se fosse o último.

O ontem já se foi e o amanhã ainda não chegou.

Autor Desconhecido

A minha família, em especial à minha avó Ivone. À nova vida que está
chegando.

AGRADECIMENTOS

Ao grande amigo Francisco Fabio pela grande força e amizade.

Professora Gláucia Pastore pela orientação. Aos professores Francisco, Gabriela e Park por participarem como avaliadores desse importante trabalho.

Aos amigos e colegas que fiz nesses dois anos de Laboratório de Bioaromas: CD (mãããs), Julhano (mostra o que??), Lu Malta, Angélica (ou Iramaia), Mariana Uenojo, Ana Simi, Rosângela (ou Romilda), Xispita, Mario, Janaína, Andréia, Lívia, Natasha, Juliana, Junio, Danieles, Tiago Coroa, Renata Falante, Renata Quietinha, Luciana Blasi, Nadir e Dora.

Às donzelas do laboratório de Carotenóides: Cíntia, Lísia, Giovanna, Natalia, Aline Bomboneeets, Michele. Ao pessoal da FEA em geral, citando alguns nomes aqui, mas lembrando de todos: Roger, Scherer, Dani Pane, Márcio, Laurão...

Aos amigos de apê Gatamorta e Fausto pela amizade. Aos Melancias, pois afinal de contas, o tempo passa, os acontecimentos mudam, os fatos se renovam, mas os bons momentos que passamos ficam em nossos corações em forma de saudade!

Minha memória impede que eu me lembre de mais pessoas, mas saibam que todos estão pra sempre gravados nesse tempo de vida e aprendizado que passei durante esse mestrado.

ÍNDICE

Apresentação

1. Resumo	01
2. Abstract.....	02
3. Objetivos	03

CAPÍTULO 1

RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES: UMA REVISÃO

1. Introdução	04
2. Processos mais utilizados em etapas de “downstream”.....	06
2.1. Separações sólido-líquido	06
2.1.1. Filtração	06
2.1.2. Sedimentação e centrifugação	07
2.2. Concentração de Produtos.....	08
2.2.1. Evaporação	08
2.2.2. Processos de Membrana.....	09
2.2.3. Extração por Solventes e Precipitação	10
2.3. Purificação	11
3. Produção de Biosurfactantes	12
3.1. Desenvolvimento de bioprocessos.....	15
4. “Downstream” para biosurfactantes: recuperação, concentração e purificação	16
4.1. Precipitação ácida e extração com solventes orgânicos	17
4.2. Fracionamento de espuma.....	18
4.3. Adsorção	21
4.4. Cromatografia.....	22

5. Recuperação de Biossurfactantes por Membranas.....	23
6. Conclusões	25
7. Referências Bibliográficas.....	26

CAPÍTULO 2

RECUPERAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis*, UTILIZANDO ULTRAFILTRAÇÃO.

1. Introdução	41
1.1. Biossurfactantes e Surfactina.....	42
1.2. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais.....	44
1.3. Processo Fermentativo	45
1.4. Extração e Purificação de Biossurfactantes	47
2. Materiais e Métodos.....	52
2.1. Produção de espuma	52
2.2. Pré-tratamento da espuma.....	54
2.3. Processo de ultrafiltração	54
2.4. Análises da solução ultrafiltrada.....	56
3. Resultados e Discussão.....	58
3.1. Curva-padrão de Surfactina	58
3.2. Caracterização do Processo	59
4. Conclusão	66
5. Referências Bibliográficas.....	68

CAPÍTULO 3

DIAFILTRAÇÃO UTILIZADA NA RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE *Bacillus subtilis*.

1. Introdução	73
2. Materiais e Métodos.....	79

2.1. Produção de espuma	79
2.2. Pré-tratamento da espuma.....	81
2.3. Processo de diafiltração	81
2.4. Análises das soluções após o processo de diafiltração.....	82
3. Resultados e Discussão.....	84
4. Conclusão	91
5. Referências bibliográficas	92

Considerações Finais

Considerações finais	99
----------------------------	----

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 01. Valores de Tensão Superficial de amostras de retido na Concentração Micelar Diluída 100 vezes, Concentração indireta de Surfactina pura (pureza 98%), estimada pela curva de calibração padrão, Concentração de sólidos totais e Relação da Concentração de Surfactina com a Concentração de Sólidos Totais	64
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 02. Valores das Concentrações de Sólidos Totais, Biossurfactante semi-purificado, Surfactina 98% [®] , e Relações do Biossurfactante semi-purificado e Surfactina 98% [®] com a concentração de sólidos totais.....	87
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 01. Imagem ilustrativa do sistema de ultrafiltração	55
Figura 02. Curva de calibração padrão da tensão superficial em relação à concentração de Surfactina 98% [®]	58
Figura 03. Relação entre as concentrações de Permeado (em mg/L) e de Retido (em g/L).....	60
Figura 04. Fluxo de permeado em função da concentração de retido	61
Figura 05. Análise das tensões superficiais das amostras de permeado e de retido.....	62

Figura 06. Variação das concentrações de Sólidos Totais e de Surfactina durante o processo.....	65
---	----

CAPÍTULO 3

Figura 07. Variação das concentrações de Sólidos Totais e de Surfactina durante o processo	85
--	----

Figura 08. Análises de Tensão Superficial nas amostras de permeado e de retido em função do número de ciclos do processo de diafiltração	85
--	----

Figura 09. Comportamento das concentrações de Sólidos Totais retidos, de Biossurfactante semipurificado retido, e de Cinzas no permeado, durante os ciclos do processo de Diafiltração.....	89
---	----

Figura 10. Imagem das amostras de retido em cada ciclo do processo de diafiltração	89
--	----

Figura 11. Grau de Pureza das Amostras durante o processo de Diafiltração, a)em relação ao Biossurfactante Semipurificado e b)em relação à Surfactina 98%®	90
--	----

RESUMO

Biossurfactantes são compostos anfifílicos produzidos por microrganismos que possuem atividade superficial, ou seja, a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos imiscíveis. Devido a suas características, esses compostos possuem uma ampla gama de potenciais utilizações que vão desde a indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica, petroquímica entre outras. O processo de recuperação e purificação de biossurfactantes é alvo de constantes aperfeiçoamentos, pois compreende, em alguns casos, até 60% do custo de produção dos mesmos. Alguns processos utilizados com mais frequência para recuperação de biossurfactantes são as técnicas de fracionamento de espuma, precipitação e extração, além da ultrafiltração. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade dos processos de ultrafiltração e diafiltração para recuperação e purificação de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis*. O processo foi conduzido com a produção de espuma via fermentação, que continha alta concentração de biossurfactantes. Após pré-tratamento, a espuma passou pelos processos de ultrafiltração e diafiltração, com parâmetros fixos e pré-estabelecidos. Os resultados da ultrafiltração mostram um aumento na concentração de biossurfactantes de 0,7 para aproximadamente 1,1 g/L, porém com um grau de pureza ainda abaixo de 50%. Já no processo de diafiltração, os resultados apontam para uma purificação de valores de pureza superiores a 50%. Uma análise final indica que ambos os processos, de concentração de biossurfactantes por ultrafiltração, e de purificação por diafiltração são viáveis e conseguem um bom rendimento, a custo baixo, sendo uma boa alternativa no “downstream” de tais produtos.

ABSTRACT

Biosurfactant are amphiphilic compounds produced by microorganisms that have superficial activity, or capacities of reducing superficial and interfacial tension between two immiscible liquids. Besides these characteristics, this compound has a large utility, going since the food industry, cosmetic, pharmacy, petrochemical among others. The biosurfactant recovery and purification process is the target of constant improvements, because it means until 60% of total production cost. Some process used with more frequency for biosurfactant recovery are foam fractionation, precipitation and extraction, besides ultrafiltration. The aim of this work was to evaluate the viability of ultrafiltration and diafiltration process for *Bacillus subtilis* biosurfactant recovery and purification. The process was conducted with a foam production by aerobic fermentation, which contained high biosurfactant concentration. After pre-treatment, the foam passes to ultrafiltration and diafiltration process, with fixed and pre-established parameters. The ultrafiltration results show an increase in the biosurfactant concentration from 0,7 to approximately 1,1 g/L, but with a lower 50% purity level. In the diafiltration process already, the results show purity levels higher than 50%. Final analysis indicates in both, the biosurfactant concentration by ultrafiltration and the biosurfactant purification by diafiltration, viability and good yield, with low cost, it might be a good alternative in “downstream process” of such products.

OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram:

- Estudar o processo de ultrafiltração de biossurfactante produzido em parâmetros fixos para determinar a viabilidade do processo;
- Avaliar os rendimentos obtidos na concentração e purificação do biossurfactante;
- Propor, estudar e avaliar o processo conhecido como diafiltração, para purificação de biossurfactante, produzido por *Bacillus subtilis*.

CAPÍTULO 1

RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES: UMA REVISÃO

1. INTRODUÇÃO

Em biotecnologia, além da desejável alta produção por parte de microrganismos que atuam como força motriz de um reator, é necessário também o emprego de eficientes tecnologias de recuperação, concentração e purificação dos produtos, pois, o complexo metabolismo dos microrganismos gera inúmeros e complexos produtos, primários e secundários. Num processo biotecnológico, os passos principais são classificados em três etapas: o *upstream*, que abrange o preparo e caracterização do substrato a ser utilizado no processo; o *central point*, onde acontece o encontro dos agentes produtores (representados pelos microrganismos) com o substrato pronto para ser utilizado, sendo o local desse encontro o biorreator; e o *downstream*, onde se encontram os processos de recuperação, concentração e purificação dos bioprodutos formados.

A etapa de *downstream* em um bioprocessamento geralmente é muito complexa. Na maioria das vezes as etapas de recuperação, concentração e purificação nunca são completas, e quando isto acontece, o produto final geralmente possui um elevado custo, o que, para processos em larga escala, torna-se completamente inviável. Mesmo assim, para diferentes setores do mercado,

diferentes graus de *downstream* são aplicados, privilegiando nesse caso a exigência dos clientes (LADISCH, 2001).

Mesmo com a otimização do meio de cultura e da produção, o processo de produção está incompleto sem meios economicamente viáveis de recuperação dos bioprodutos. Para muitos produtos biotecnológicos, os custos com etapas de *downstream* giram em torno de 60% do total dos custos de produção (DESAI & BANAT, 1997; MUKHERJEE et al, 2006).

O primeiro passo a ser analisado em etapas de *downstream* é em qual seqüência se encontra o bioproduto formado baseado na sua geração, a partir de um microrganismo ou de uma biotransformação catalisada por uma enzima imobilizada. Se o produto em questão é oriundo de células vivas, deve-se observar se sua origem é intracelular ou extracelular. Transformações bioquímicas também representam outra fonte de bioprodutos (LADISCH, 2001).

Nas etapas de *downstream*, assim como em qualquer desenvolvimento de um novo processo, a ampliação gradativa de escala é fundamental para um processo seguro do ponto de vista comercial e industrial. Os testes laboratoriais apontam os pontos de melhoria do processo (SANTOS, 2001), enquanto que os testes em escala piloto desenvolvem os processos, determinando modelos e facilitando a mudança para a escala industrial (BARROS, 2007).

2. PROCESSOS MAIS UTILIZADOS EM ETAPAS DE “DOWNSTREAM”

2.1. Separações sólido-líquido

Tais processos são usualmente métodos mecânicos de separação, e são aplicados a misturas heterogêneas. São baseados em diferenças físicas entre os sólidos em suspensão (partículas) tais como diferenças em tamanho, espessura e densidade (WIESMANN & BINDER, 1982). Para separar sólidos em suspensão de seus líquidos, dois princípios são usados:

- Retenção do componente sólido usando meio filtrante;
- Utilização da diferença de taxa de sedimentação de partículas se movendo através do líquido. Essa diferença pode ocorrer por efeito da gravidade (decantação) ou por meio de um campo induzido, por exemplo um campo centrífugo (centrifugação).

2.1.1. Filtração

Filtração é a técnica de separar suspensões sólido-líquido, em uma parte concentrada (torta) e outra diluída (filtrado) (DI BERNARDO, 1980). O meio filtrante é o agente separador. O princípio da filtração é baseado na diferença geométrica entre sólidos suspensos e os poros do meio filtrante (WILLIS & TOSUN, 1980; STAMATAKIS & TIEN, 1991).

Em bio-filtração, entretanto, quase que a totalidade das partículas fica retida. Para a filtração, importantes parâmetros são avaliados: procedimentos de

limpeza/comportamento de entupimento, resistência química, resistência ao escoamento e durabilidade (COHEN, 2001).

Algumas vantagens se destacam neste tipo de processo como: alto rendimento e facilidade de remoção da torta de filtro na maioria dos casos. Uma grande desvantagem é o alto capital de investimento necessário (DI BERNARDO, 1980).

2.1.2. Sedimentação e centrifugação

Sedimentação e centrifugação são duas das operações unitárias mais utilizadas em biotecnologia. A sedimentação gravitacional requer equipamento em larga escala e o tempo de residência é muito grande (WIESMANN & BINDER, 1982; SCHUCK et al, 1998).

Numa centrífuga, o campo gravitacional é substituído por um campo de força centrífuga, que requer um pequeno equipamento e, conseqüentemente, pequenos tempos de residência (além de altas recuperações por unidade de volume por equipamento) (COHEN & CLAVERIE, 1975; WIESMANN & BINDER, 1982).

Centrífugas oferecem vantagens sobre filtros e tanques de sedimentação. Entre estas podem ser citadas: o fato de permitir um processo contínuo ou com muitas bateladas, alta capacidade e baixo tempo de processo, operação com produtos estéreis (esterilização a vapor) assim como manutenção de condições, ou seja, controle dos parâmetros de processo. Porém existem também algumas desvantagens: alto investimento de capital, altos custos de manutenção, alto

consumo de energia, o concentrados pastosos (com parcela de 5 a 20% (p/p) de sólidos secos), além do sobrenadante não ser livre de células restando aproximadamente de 10^3 a 10^5 células/ml (COHEN & CLAVERIE, 1975).

2.2. Concentração de Produtos

Após separar praticamente todas as células do meio, o filtrado contém 85% a 98% de água (PERRY & CHILTON, 1973). Por essa razão, o próximo passo num processo de concentração é quase sempre focado na remoção de água. Isso pode ser feito por evaporação, processos de membrana, extração líquido-líquido e precipitação.

2.2.1. Evaporação

É um processo que requer calor como uma fase auxiliar para remover água de uma solução. Calor, carregado como vapor, converte parcialmente a solução em vapor. O vapor é então removido da solução e condensado (McCABE & SMITH, 1976).

Com base nessas quatro etapas, uma grande variedade de equipamentos é desenvolvida, desde escala laboratorial, com capacidade de 0,5 a 1,0 L/h de capacidade de evaporação de água, até escala industrial muito alta, tais como a água aproveitável da água do mar, de capacidade de evaporação a 150 m³/h. A evaporação é um processo simples, porém, em muitos casos, um alto consumo de energia é necessário para a remoção de água. Entretanto, devido a sua

acessibilidade e simplicidade, é freqüentemente aplicado em larga escala (McCABE & SMITH, 1976).

2.2.2. Processos de membrana

Processos de membrana são mais aplicados atualmente, há menos energia a ser consumida, além do fato de ser usado como primeiro passo da purificação. Membranas são principalmente aplicadas na indústria de laticínios, e em biotecnologia para melhorar a separação e concentração de soluções aquosas (CAPANNELLI, 1983). A aplicação de membranas não se restringe à separação celular ou molecular.

O processo de membrana pode se distinguir de acordo com o tipo de força diretora que guia o transporte através da mesma. Microfiltração separa grandes partículas de uma suspensão, e ultrafiltração é o termo usado quando os poros do filtro são suficientemente pequenos para reter as macromoléculas. Hiperfiltração algumas vezes se refere à osmose reversa (ALBERTSON, 1977).

Na maioria dos processos de biosseparação a diferença de pressão hidrostática é a força diretora (NGUYEN et al, 1979; NGUYEN et al, 1980; NGUYEN et al, 1983; NGUYEN & NEEL, 1983). Os processos de membrana possuem diversas vantagens sobre outras técnicas de concentração por não necessitar de fase auxiliar, por poderem ser conduzidos à temperatura ambiente, pela possibilidade de processos contínuos ou de batelada, além de permitir uma ampliação de escala relativamente simples (ALBERTSON, 1977). Contudo, algumas desvantagens também são reportadas, como por exemplo a pouca

resistência a valores de pH e temperatura extremos, dificuldade de limpeza e esterilização, e entupimento.

As membranas são fabricadas com uma grande variedade de materiais, se usando de várias técnicas de confecção. A seletividade da membrana é expressa em termos de peso molecular limite de permeabilidade (MWCO) (ELIMELECH & BHATTACHARJEE, 1998) . Numa membrana ideal de ultrafiltração, todas as moléculas abaixo do valor de MWCO serão permeadas, enquanto que todas as outras moléculas permanecerão retidas. Em contraste com a ultrafiltração, a microfiltração lida com sólidos suspensos. Microfiltração tangencial é bem usada como alternativa frente à filtração normal. Um enxágüe em contra-corrente é necessário para manter o fluxo de solução suficientemente alto durante o processo (TRAN-HA & WILEY, 1998).

2.2.3. Extração por Solventes e Precipitação

Extração por solvente é uma das operações unitárias clássicas mais versáteis para a recuperação de bioprodutos. Pode ser aplicada em produtos com uma grande faixa de propriedades físico-químicas. Em processos biotecnológicos, entretanto, a extração é predominantemente aplicada na recuperação de metabólitos secundários lipofílicos. Considera-se a extração, neste contexto, mais uma técnica de enriquecimento do que uma técnica de purificação, mesmo que na prática, uma purificação substancial seja atingida (BANAT, 1995).

Precipitação é um método bem estabelecido para recuperação de proteínas e é muito usado para recuperação de proteínas de peso molecular médio. Em

precipitação, a solubilidade é reduzida para adição de sais (salting out) ou solventes orgânicos. Pode ser aplicada para fracionar proteínas (tipos diferentes de separação), como é feito no processamento de plasma sanguíneo, ou como método de redução de volume. A precipitação pode também ser empregada como primeiro passo de purificação, antes de métodos de alta resolução, por exemplo para ativar a remoção de pós-produtos não desejáveis tais como ácidos nucleicos, pigmentos e outros componentes residuais do meio (KIM et al, 1997).

2.3. Purificação

Purificação é o final e, em muitos casos, o passo essencial na cadeia da recuperação. Dependendo do grau de purificação, esse tipo de processo é geralmente caro e as operações resultam em baixos rendimentos (McCABE & SMITH, 1976). A purificação, neste contexto, é restrita a processos de sorção, como por exemplo, a adsorção e a cromatografia.

Os mecanismos dos processos de sorção podem ser divididos em cinco categorias. Por exemplo, a primeira, é mais ou menos uma forma de exclusão por tamanho. A permeação do gel é baseada nesse fenômeno. Grandes moléculas não entram nos poros, enquanto que pequenas moléculas o fazem. O resultado é uma diferença de velocidade entre grandes e pequenas moléculas. De fato, a separação é conseguida com base na cinética (McCABE & SMITH, 1976; COLLINS, 1997; TÓTH, 2002).

Grandes moléculas não podem penetrar nos grânulos de gel e passam rapidamente pelo leito. Pequenas moléculas penetram nos grânulos e seu

progresso através da linha torna-se muito maior. Em todos os outros casos o fenômeno de superfície de sorção desempenha um papel dominante. As interações de Van der Waals criam uma fraca camada na superfície da macromolécula (ROTH & LENHOFF, 1995). Superfícies carregadas são aptas a ligar moléculas com uma rede em função das cargas opostas. Finalmente, ligações bioespecíficas podem acontecer de forma que as moléculas que se ligam a sua superfície o fazem como carreador; da mesma maneira como uma chave numa fechadura (COLLINS, 1997; TÓTH, 2002).

Existem, basicamente, duas maneiras de colocar em contato o fluido com o sorvente: o processo em batelada e o contínuo. Em procesos biotecnológicos, entretanto, somente o modo batelada é empregado (DECHOW, 1989). Assim sendo, o modo batelada é dividido em dois tipos: o do tanque agitado (DUBEY et al, 2005), e o leito empacotado (COSTA, 2005).

3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes são compostos anfifílicos produzidos por microrganismos que possuem atividade superficial, ou seja, a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos imiscíveis (DESAI & BANAT, 1997; MAIER, 2003; GAUTAM & TYAGI, 2006). Estas propriedades derivam do fato de que estes compostos possuem uma parte da molécula polar e outra apolar (MAIER, 2003; BARROS et al, 2007). Há uma enorme variedade de grupamentos ou componentes que fazem com que se tenha um grande número tipos de biossurfactantes estruturalmente diferentes. Entre os grupos mais importantes

temos: lipopeptídios e lipoproteínas, glicolipídios (ramnolipídios, trealolipídios e sorfolipídios), fosfolipídios, ácidos graxos neutros, materiais particulados e polímeros (DESAI & BANAT, 1997; BOGNOLO, 1999; MAIER, 2003).

Devido a suas características, esses compostos possuem uma ampla gama de potenciais utilizações que vão desde a indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica, petroquímica entre outras (KOSARIC, 1992; DESAI & BANAT, 1997). No entanto, praticamente todos os surfactantes utilizados são sintéticos (DESAI & BANAT, 1997), os biossurfactantes, de modo geral, têm sido limitados a poucas, e especializadas aplicações, devido seus preços não competitivos (FIECHTER, 1992), contudo uma crescente parte destes vem sendo substituída por compostos produzidos por síntese enzimática ou microbiana (GAUTAM & TYAGI, 2006). Esta mudança tem ocorrido especialmente por características como baixa toxicidade e biodegradabilidade (MAKKAR & CAMEOTRA, 1999).

O uso de substratos renováveis em processos biotecnológicos é apontado como uma alternativa para a viabilização econômica destes, pois a matéria-prima é parte significativa quando considerados os custos de produção (FIECHTER, 1992; CAMEOTRA et al 1998). Estima-se que as matérias-primas para processos biotecnológicos representem de 10 a 30% do custo de produção (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002). Atualmente uma grande variedade de resíduos agroindustriais é reportada como meios de cultura em processos biotecnológicos (GAUTAM & TYAGI, 2005; RAMACHANDRAN et al., 2007), inclusive biossurfactantes (MAKKAR & CAMEOTRA, 1999). Os substratos utilizados para produção de biossurfactantes são basicamente de três grupos: substratos com

alta carga de carboidratos, óleos vegetais e hidrocarbonetos (GAUTAM & TYAGI, 2006).

Tradicionalmente os hidrocarbonetos têm sido utilizados na produção de biossurfactantes, contudo, outros resíduos agroindustriais têm sido utilizados. Mercade & Manresa (1994) relatam a produção de ramnolipídio por *Pseudomonas* sp JAMM utilizando resíduo da prensagem de óleo de oliva. Ohno et al. (1995) reportam o uso de resíduo sólido de soja na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* MI 113 em um processo de fermentação de fase sólida. Deshpande & Daniels (1995) utilizaram gordura animal para produção de sorfolipídios por *Candida bombicola*. Outros resíduos tais como óleo de fritura e sabões produzidos durante o refino de óleos vegetais também foram estudados (MANEERAT, 2005)

O grupo mais extenso, contudo é o de substratos com altos teores de carboidratos. Melaço foi usado para produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* GS3 (PATEL & DESAI, 1997) e por *Bacillus subtilis* MTCC (MAKKAR & CAMEORTA, 1997) e LB5a (NITSCHKE et al, 2004). No mesmo estudo, Nitschke et al (2004), mostraram um estudo comparativo entre três diferentes substratos ricos em carboidratos: melaço de cana, soro de leite e manipueira. Utilizando-se da redução superficial como parâmetro, foi mostrado que a manipueira apresentou os melhores valores. O soro de leite também foi apontado como meio de cultura para produção de lipopeptídios por *B.licheniformis* cepa P40 (CLADERA-OLIVEIRA, 2004).

Thompsom et al (2000), e Fox & Bala (2000), relatam o uso de batata, substrato rico em amido, para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Trabalhos reportados por Nitschke et al (2004), Costa (2005) e

Barros (2007) usando *Bacillus subtilis* linhagem LB5a, apontam a manipueira como substrato de grande potencial, sendo o amido e, secundariamente, a sacarose, as principais fontes de carbono (NITSCHKE, 2004).

3.1. Desenvolvimento de bioprocessos

Além do uso de substratos alternativos o desenvolvimento de processos fermentativos, equipamentos e métodos de extração também são apontados, pois, segundo Desai & Banat (1997), o desenvolvimento das condições de fermentação tem resultado num crescimento da produtividade, tornando os biossurfactantes mais atrativos. Em concordância com essa premissa, diversos trabalhos apontam na realização de estudos referentes à otimização das condições de cultivo para a produção de biotensoativos.

Um processo de otimização consiste na determinação das melhores combinações de fatores essenciais ao desenvolvimento da cultura (MUKHERJEE & SEN, 2006). Para isso, técnicas clássicas ou através de metodologia estatística apropriada foram utilizadas para otimização dos constituintes de meios sintéticos (GU et al, 2005), proporção e tempo de incubação do inóculo (SEN & SWAMINATHAN, 2004), temperatura, agitação nos fermentadores ou a combinação de diversos dos fatores citados (SEN & SWAMINATHAN, 1997; JACQUES et al, 1999; CLADERA-OLIVEIRA et al, 2004).

A genética de um microrganismo produtor é um importante fator que afeta a produtividade de produtos biotecnológicos (MUKHERJEE et al, 2006). As técnicas de manipulação genética também têm permitido uma maior velocidade na

identificação de microrganismos potencialmente úteis (HSIEH et al, 2004), compreensão das vias metabólicas (SULLIVAN, 1998; PEYPOUX et al, 1999; TSUGE et al, 2001), alteração de suas propriedades biológicas (SYMMANK et al, 2000) e , especialmente, o aumento na produção (MULLIGAN et al, 1989; YAKIMOV et al, 2000; OHNO et al, 1995; LIN et al, 1998 (b)) destes bioprodutos.

Além dos parâmetros citados, o processo de recuperação e purificação também é alvo de constantes aperfeiçoamentos, pois compreende, em alguns casos, até 60% do custo de produção de bioprodutos (DESAI & BANAT, 1997).

4. “DOWNSTREAM” PARA BIOSSURFACTANTES: RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Um bioprocessamento eficiente e econômico é a fundação de toda indústria biotecnológica num mercado competitivo. Qualquer tentativa de aumento do rendimento de produção de um biossurfactante demanda otimização do meio de cultura, e seleção de condições ótimas da própria cultura vão induzir ao máximo ou ótimo de produtividade. Similarmente, eficientes técnicas de *downstream* nos processos e métodos são necessárias para máxima recuperação do produto final (MUKHERJEE et al, 2006).

4.1. Precipitação ácida e extração com solventes orgânicos

A insolubilidade dos biossurfactantes a baixos valores de pH é uma maneira de separá-los do meio em que se encontram. Um exemplo é o da recuperação dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* (DESAI & BANAT, 1997; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; SEN & SWAMINATHAN, 2005; YEH et al 2006; COSTA, 2005; BARROS, 2007). A prática usual para a recuperação química de surfactina envolve precipitação a pH, utilizando ácidos fortes como HCl, acidificando-se assim o meio (SEN & SWAMINATHAN, 2005). As vantagens de tal processo é que não envolve instrumentos ou aparelhos complexos (MUKHERJEE et al, 2006), além de possuir um custo baixo e ser eficiente na recuperação do biossurfactante bruto.

Outro exemplo é a precipitação utilizando sulfato de amônio, onde ocorre o *salting out* do biossurfactante polimérico ou rico em proteínas, mas assim como a precipitação ácida, não necessita de equipamentos complexos, e limita-se a pequenas separações (SHABTAI, 1986).

Os biossurfactantes possuem a característica de serem solúveis em solventes orgânicos devido à presença de sua terminação hidrofóbica (MUKHERJEE et al, 2006; BARROS, 2007). Geralmente, o processo de extração por solvente orgânico é o próximo passo após a precipitação ácida. Na literatura reportam-se empregos dessas técnicas para recuperação de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* (DESAI & BANAT, 1997; DUBEY et al, 2005) e também de surfactina de *Bacillus subtilis* (MAKKAR & CAMEOTRA 1997, COSTA, 2005;

BARROS, 2007). A recuperação de biossurfactantes utiliza-se da técnica de extração com solventes como metanol e clorofórmio (NITSCHKE, 2004).

Outros solventes também aparecem como alternativas de extração. É o caso do Metil Éter terc-Butil (MTBE) aplicado na extração de biossurfactantes de *Rhodococcus* (KUYUKINA et al, 2001). Devido a certas características do MTBE, tais como toxicidade relativa baixa, biodegradabilidade, facilidade na recuperação, baixa inflamabilidade e baixo risco de explosão, o uso de tal solvente como agente de extração em escala industrial, para produção de biossurfactante, é viável.

As vantagens encontradas em processos de extração com solvente orgânico são apontadas como eficiência na recuperação do biossurfactante e em sua purificação parcial. Uma desvantagem clara é a não-utilização em processos de larga escala, devido à inviabilidade de se montar equipamentos grandes, sem falar nos custos elevados do processo por conta do encarecimento dos solventes (MUKHERJEE et al, 2006).

4.2. Fracionamento de espuma

A técnica de fracionamento de espuma toma proveito de propriedades dos biossurfactantes como as interações com a superfície de líquidos. Devido a esta atividade superficial, se formam partições na espuma do líquido que facilitam a separação (ROSA et al, 2007).

Historicamente, este tipo de separação tem aplicação em separação de contaminantes de rios na década de 60 (GRIEVES & ARONICA, 1966). O passo seguinte foi dado na recuperação de proteínas pelo mesmo fracionamento de

espuma (AHMAD, 1975). Caracterizações para melhorar o modelo do processo foram feitas desde então, dentre elas a distribuição da concentração de proteína na espuma ao longo da coluna, passando por parâmetros como tamanho das bolhas, posição de elevação do líquido, e isothermas de adsorção (DU et al, 2000).

Paralelamente temos o desenvolvimento da mesma técnica para a recuperação de biossurfactantes. Publicações sobre o assunto surgem na década de 90 (ARMSTRONG et al, 1994; CHEN et al, 1994) e ganham certo desenvolvimento nos anos seguintes.

Razafindralambo e colaboradores (1996) investigaram as propriedades de fracionamento de espuma aplicada na recuperação do biossurfactante surfactina, produzido por *Bacillus subtilis*. Os parâmetros de comparação foram o surfactante sintético Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e soro bovino de albumina (BSA). Os resultados apontam que o tempo necessário para formação de volume de espuma foi similar para diferentes concentrações, enquanto que a quantidade máxima de líquido na espuma aumentou conforme aumentava a concentração. Observa-se uma alta performance da surfactina como agente espumante frente a dois exemplos de moléculas que, como a própria surfactina, são anfifílicas. Sua excelente capacidade de formar espuma e estabilidade vem essencialmente de sua forte atividade superficial, e provavelmente devido a boas propriedades mecânicas e reológicas de seu filme de absorção superficial.

Outro trabalho também surgiu no intuito de avaliar com mais propriedade a recuperação de espuma contendo surfactina, após produção por fermentação (DAVIS et al, 2001). Os resultados mostraram que a recuperação de biossurfactante por fracionamento de espuma é um método em potencial, no caso

aplicado acima. Outro fator avaliado foi a velocidade de agitação, que mostrou afetar a taxa de formação de espuma e assim a eficiência na separação de surfactina. Os resultados mostram que, numa agitação ótima, a 166 rpm, ocorreram as maiores taxas de enriquecimento e recuperação.

A aplicação dessa técnica se deu em trabalhos mais recentes, em recuperação de biossurfactantes produzidos em resíduo agroindustrial (manipueira). A fermentação, com parâmetros controlados de aeração e agitação, produziu espuma em grande quantidade, aproximadamente 21% do volume inicial e com concentração maior que 25 vezes a concentração no mosto. Sabendo-se que a espuma continha as maiores concentrações de biossurfacante, a mesma era recolhida e, naturalmente entrava em colapso, aglomerando-se na forma de líquido. Esse líquido sofre os posteriores tratamentos e processos de purificação (COSTA, 2005; BARROS, 2007).

As principais vantagens do sistema estão na não necessidade de equipamentos de grande potência, presença de solventes, entre outros (MUKHERJEE et al, 2006), e em permitir a recuperação primária em processos contínuos (NOAH et al, 2002) e de batelada (DAVIS et al, 2001). Além disso, é bastante eficiente na separação de compostos tensoativos, conseguindo, em alguns casos, superar em 60 vezes o valor de concentração da solução inicial (DAVIS et al, 2001).

Entre as desvantagens está o fato de que quando acoplado ao fermentador, carrega consigo células, além dos componentes do meio fermentativo, sendo sempre necessária uma ou mais etapas adicionais de purificação (SANTOS, 2001; YEH et al, 2006) e no fato de que com um o aumento

da concentração do bioproduto no meio de cultura, há uma redução na capacidade de arraste do tensoativo (ROSA et al, 2007).

4.3. Adsorção

Nessa técnica, os biossurfactantes são adsorvidos em resinas poliméricas e, subseqüentemente, dessorvidas com solventes orgânicos. Também pode ser usado como adsorvente carvão ativado (MUKHERJEE et al, 2006). Um exemplo de aplicação dessa técnica data da década de 80, onde os autores investigavam tal técnica em laboratório, e as colunas eram preenchidas com resinas de poliestireno (REILING et al, 1986). Porém, recentemente, a evolução tecnológica das colunas de adsorção permitiu que colunas recheadas com carvão ativado pudessem ser usadas para a recuperação de biossurfactantes (DUBEY et al, 2005; LIU et al, 2007).

Dubey e colaboradores (2005) aplicaram a técnica de adsorção com colunas de carvão ativado para recuperação de biossurfactante, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* de resíduos de fermentados em destilaria. A parâmetros controlados a eficiência de adsorção chegou a 99,5 %. A concentração do carvão ativado facilitou a remoção completa do biossurfactante da espuma colapsada. O processo, segundo os autores, evita inibição do produto final, reduz o alto custo dos solventes, e minimiza a degradação do produto.

O carvão ativado também foi usado no processo de recuperação da surfactina de *Bacillus subtilis* (LIU et al, 2007). Entre os fatores estudados estão taxa de agitação, tamanho de partícula de carvão ativado, pH, temperatura,

concentração inicial de adsorbato, quantidade de adsorvente e força iônica da solução. Os resultados indicam que o transporte externo de surfactina da solução aquosa para a superfície adsorvente é muito rápido para ser avaliado. A taxa de adsorção se eleva conforme aumenta a temperatura de adsorção. Quanto à concentração de surfactina, enquanto a mesma diminuía na fase líquida, a taxa de adsorção de surfactina no carvão ativado tornava-se maior, porém numa velocidade bem pequena.

4.4. Cromatografia

A etapa de purificação de um biossurfactante geralmente termina, na maioria dos casos, no processo de cromatografia. Os biossurfactantes carregados ficam aderidos aos recheios da coluna cromatográfica, e posteriormente podem ser eluídos com solução tampão apropriada. A cromatografia possibilita alta e eficiente recuperação, além de um alto grau de pureza (MUKHERJEE et al, 2006).

Exemplos de processos cromatográficos estão tanto na purificação quanto no intuito de quantificar o biossurfactante no final do processo. Existem estudos de cromatografia de adsorção e cromatografia de troca iônica aplicadas à purificação de ramnolípídeo de *Pseudomonas aeruginosa* (REILING et al, 1986), cromatografia de interação hidrofóbica em biossurfactante de *Streptococcus termophilus* A (RODRIGUES et al, 2006), além de cromatografia líquida de alta eficiência aplicada à quantificação e purificação de surfactina de *Bacillus subtilis* (MULLIGAN E GIBBS, 1990; LIN et al, 1997; LIN et al, 1998 (a)).

Outros trabalhos relacionados à purificação de biossurfactante produzidos por *Bacillus subtilis*, são os relacionados aos da linhagem LB5a, em coluna aberta, com sílica gel como fase estacionária, e metanol e clorofórmio em concentrações variáveis, seguido por purificação em coluna aberta com sephadex (NITSCHKE, 2004; COSTA, 2005), conseguindo, segundo os autores, elevados níveis de pureza.

5. RECUPERAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR MEMBRANAS

Os processos de separação por membrana são apontados como eficientes processos de recuperação e concentração de biossurfactantes. A microfiltração é mais usada para recuperação dos biossurfactantes oriundos do meio fermentativo, ou da espuma de fermentação, pois consegue separar componentes celulares e células inteiras, evitando assim um crescimento indesejável pós-biorreação (RODRIGUES et al, 2006). Porém poucos estudos ainda existem sobre o processo, pois o meio de separação mais usado ainda é a centrifugação, pois conseguia separar as moléculas de biossurfactante após a precipitação ácida (MULLIGAN E GIBBS, 1990; LIN et al, 1997; DESAI & BANAT, 1997, CAMEOTRA & MAKKAR, 2002; LIN et al, 1998 (b); NITSCHKE, 2004; COSTA, 2005; RODRIGUES et al, 2006, MUKHERJEE et al, 2006; BARROS, 2007).

A ultrafiltração é um processo de separação por membranas que permite recuperar, concentrar e purificar parcialmente os biossurfactantes. A ultrafiltração utiliza a propriedade dos biossurfactantes de formar micelas após certa concentração, chamada de concentração micelar crítica (CMC) (MUKHERJEE et

al, 2006). A partir desta concentração, os biossurfactantes formam agregados relativamente estáveis chamados micelas (HUNTER, 1993). A formação destes agregados, que na surfactina, por exemplo, pode conter de 50 a 100 moléculas (MULLIGAN & GIBBS, 1990; SEN & SWAMINATHAN, 2005) faz com que estes compostos atinjam diâmetros suficientemente grandes para que sejam separados por processos de ultrafiltração (MULLIGAN & GIBBS, 1990; LIN et al, 1997).

O uso de sistemas micelares (ou todos os tipos de sistemas de surfactantes incluindo microemulsão, vesículas, etc.), com a finalidade de separar moléculas, tem se tornado um campo de interesse cada vez maior. Esses sistemas têm provado ser extremamente promissores em diferentes aplicações potenciais, tais como: remoção de íons metálicos de ambientes aquosos, remoção de compostos de baixo peso molecular e resolução de enantiômeros (XIARCHOS et al., 2003).

Estudos dos parâmetros de ultrafiltração são feitos avaliando principalmente os parâmetros de pressão transmembrana, peso molecular limite de membrana (MWCO), pH e temperatura (MULLIGAN E GIBBS, 1990; LIN et al, 1997; LIN et al, 1998 (b), SANTOS, 2001; RAMNANI, 2005, SEN & SWAMINATHAN, 2005). Mulligan e Gibbs (1990) realizaram testes com ultrafiltração em membranas de 10, 30, 50, 100 e 300 KDa, a uma pressão de 172 KPa. Foram realizadas análises de tensão superficial, CMC e concentração de aminoácidos.

Lin e colaboradores (1997) relataram o uso de ultrafiltração de biossurfactantes de *Bacillus subtilis* linhagem ATCC 21332 e posteriormente de biossurfactantes de cepas mutantes de *Bacillus licheniformis* linhagem JF-2 (LIN

et al, 1998 (b)), obtendo rendimentos acima de 90%. A membrana permeia moléculas menores, e retém as surfactinas organizadas em micelas.

Para SEN & SWAMINATHAN (2005), no caso de moléculas de 10 Å a 500-1000 Å de diâmetro, a ultrafiltração mostra ser uma boa alternativa. Neste caso a espuma foi agregada da fermentação e misturada a 200 mL do caldo fermentativo, e centrifugada para remoção das células por precipitação. A membrana usada foi uma de 50 KDa. O efeito do pH na solução de surfactina no fluxo de permeado foi avaliado e, de acordo com uma combinação ótima entre pH e fluxo de permeado, um pH fixo foi determinado. O percentual de pureza da surfactina obtida nesse caso foi muito maior (70%) que aquele obtido com precipitação ácida e extração (32%). Portanto, um melhor entendimento das características importantes da ultrafiltração, bem como os fatores de operação, ajudam na otimização e concentração e purificação do produto final.

6. CONCLUSÕES

Os processos de recuperação, concentração e purificação em biotecnologia são de suma importância pois são responsáveis pelas maiores determinações de viabilidade de mercado de um produto biotecnológico, como custo final de processo, ampliação de escala e pureza final do produto.

No campo dos biossurfactantes essa afirmação é extremamente relevante. Ao longo dos anos têm-se estudado várias alternativas de processos de *downstream* aplicados aos diversos biossurfactantes. Apesar de diferenças estruturais, os biossurfactantes têm características em comum, como por exemplo

a estrutura molecular anfifílica, a alta atividade superficial, e o poder de formação de estruturas micelares em altas concentrações.

É do estudo dessas características que se encontra a determinação do melhor ou dos melhores processos de recuperação, concentração e purificação dos biossurfactantes. Dificilmente um processo será suficiente para recuperação dos biossurfactantes, concentração dos mesmos, bem como um alto grau de pureza. A combinação dos processos é que determinará o grau de pureza ideal do produto. É certo que, em experimentos futuros, uma otimização da combinação dos processos será necessária, e possibilitará uma recuperação quase que completa, e concentração e purificação em diferentes graus, de acordo com a exigência do mercado consumidor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S. I. Laws of Foam Formation and Foam Fractionation. I. The Effect of different Operating Parameters on the Foam Fractionation of Albumin from a Solution Containing Organic and Inorganic Materials. **Separation Science**, Vol. 10, No. 6. pp. 673-688, 1975.

ALBERTSON, P. A. **Ultrafiltration Handbook**. Technomic Publishing, Lancaster, USA, 1977.

ARMSTRONG, Daniel W.; ZHOU, Eve Y.; CHEN, Shushi. Foam flotation enrichment of enantiomers. **Analytical Chemistry**, 66: 278-282, 1994.

BARROS, Francisco Fábio Cavalcante. **Estudo das Variáveis de Processo e Ampliação de Escala na Produção de Biosurfactante por *Bacillus subtilis* em Manipueira.** Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007, 102 p.

BARROS, F.F.C; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, São Paulo, 2007.

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

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

CAPANNELLI, G.; VIGO, F.; MUNARI, S. Ultrafiltration membranes — characterization methods. **Journal of Membrane Science**, 15(3): 289-313, 1983.

CHEN, Chulin; TIMMONS, Michael B.; BISOGNI Jr, James J.; ANESHANSLEY, Daniel J. Modeling Surfactant Removal in Foam Fractionation: I - Theoretical Development. **Aquacultural Engineering**, 13: 163-181, 1994.

CLADERA-OLIVEIRA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. 21: 53-58, 2004.

COHEN, Yariv. Biofiltration - a new treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter beding material: a review. **Bioresource Technology** 77 (3): 257-274, 2001.

COHEN, R.; CLAVERIE, J. M. Sedimentation of generalized systems of interacting particles. II. Active enzyme centrifugation--theory and extensions of its validity range. **Biopolymers** 14 (8): 1917-1933, 1975.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução aos Métodos Cromatográficos**. Editora Unicamp, Campinas, 1997.

COSTA, G. A. N. **Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações**. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005, 87p.

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.

DECHOW, F. J. **Separation and Purification Techniques in Biotechnology.**

Noyes publishing, Park Ridge (NY), USA, 1989.

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

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**. 54 (2): 143-150, 1995.

DI BERNARDO, Luiz. Teoria da filtração. **Revista DAE** 40(123):49-68, 1980.

DU, L.; PROKOP, A.; TANNER, R. D. Effect of bubble size on foam fractionation of ovalbumin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 98-100: 1075-1091, 2000.

DUBEY, Kirti V.; JUWARKAR, Asha A.; SINGH, S. K. Adsorption-Desorption Process Using Wood-Based Activated Carbon for Recovery of Biosurfactant from Fermented Distillery Wastewater. **Biotechnology Progress**. 21: 860-867, 2005.

ELIMELECH, M.; BHATTACHARJEE, S,. A novel approach for modeling concentration polarization in crossflow membrane filtration based on the

equivalence of osmotic pressure model and filtration theory. **Journal of Membrane Science**. 145: 223-241, 1998.

FIECHTER, A. Biosurfactants: Moving Towards in Industrial Application. **Trends in Biotechnology**. 10 (6): 208-217, 1992.

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

GAUTAM, K.K.; TYAGI, V.K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**. 55: 155-166, 2006.

GRIEVES, R. B.; ARONICA, R. C. Foam fractionation of phenol. **Nature**. 210 (39): 901-903, 1966.

GU, X.; ZHENG, Z.; YU, H.; WANG, J.; LIANG, F.; LIU, R. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochemistry**. 40: 3196-3201, 2005.

HSIEH, F.C.; LI, M.C.; LIN, T.S.; KAO, S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**. 49: 186-191, 2004.

HUNTER, R. J. **Introduction to Modern Colloid Science**. Oxford: Oxford University Press, 1993.

JACQUES, P.; HBID, C.; DESTAIN, J.; RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; DE PAUW, E.; THONART, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* M4 by Plackett-Burman design. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 77:223–233, 1999.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 84: 41-46, 1997.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**. 64:1731-1737, 1992.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**. 46: 149-156, 2001.

LADISCH, M. R. **Bioseparations Engineering - Principles, Practice and Economics**. John Wiley & Sons, New York, USA, 2001.

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.

LIN, S. C.; CHEN, Y. C.; LIN, Y. M. General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactants analysis and purification. **Journal of Chromatography A**, 825: 149-159, 1998 (a).

LIN, Sung-Chyr; LIN, Kuo-Ging; LO, Chih-Chen; LIN, Yo-Ming. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme and Microbial Technology**. 23: 267-273, 1998 (b).

LIU, T.; MONTASUC, L.; GANCEL, F.; ZHAO, L.; NIKOV, I. Integrated process for production of surfactin. Part I: Adsorption rate of pure surfactin onto activated carbon. **Biochemical Engineering Journal**, 2007. Article in press doi: 10.1016/j.bej.2007.01.025

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 27(3): 675-683, 2005.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**.18: 37-42, 1997.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - a review. **Journal of Surface Detection**. 2: 237-241, 1999.

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.

McCABE, W. L.; SMITH, J. C. **Unit Operations of Chemical Engineering**. 3rd Edition. McGraw Hill, New York, USA, 1976.

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

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R.. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. 24 (11): 509-515, 2006.

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

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

NGUYEN, Quang Trong; APTEL, Philippe; NEEL, Jean. Characterization of ultrafiltration membranes Part I. Water and organic-solvent permeabilities. **Journal of Membrane Science**, 5: 235-251, 1979.

NGUYEN, Quang Trong; APTEL, Philippe; NEEL, Jean. Characterization of ultrafiltration membranes Part II. Mass transport measurements for low and high molecular weight synthetic polymers in water solutions. **Journal of Membrane Science**, 7 (2): 141-155, 1980.

NGUYEN, Quang Trong; NEEL, Jean. Characterization of ultrafiltration membranes Part III. Role of solvent media and conformational changes in ultrafiltration of synthetic polymers. **Journal of Membrane Science**, 14 (2): 97-109, 1983.

NGUYEN, Quang Trong; NEEL, Jean. Characterization of ultrafiltration membranes Part IV. Influence of the deformation of macromolecular solutes on the transport through ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, 14 (2): 235-251, 1983.

NITSCHKE, M. **Produção e Caracterização de Biossurfactante de *Bacillus subtilis* Utilizando Manipueira como Substrato**. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004, 88p.

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

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. 47: 209-214, 1995.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**. 25 (2): 91-94, 1997.

PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Chemical Engineers Handbook**. 5th Edition. McGraw Hill, New York, USA, 1973.

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

RAMACHADRAN, S.; SINGH, S.K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications - a review. **Bioresource Technology**, 98: 2000-2009, 2007.

RAMNANI, P.; KUMAR, S. S.; GUPTA, R.. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. **Process Biochemistry**, 40: 3352-3359, 2005.

RAZAFRINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; BANIEL, A.; POPINEAU, Y.; HBID, C.; JACQUES, P.; THONART, P. Foaming Properties of Surfactin, a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Journal of American Oil Chemists Society**, 73 (1): 149-151, 1996.

REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L. H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIETCHER, A. Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 51 (6): 985-989, 1986.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; MEI, H. C. van der; OLIVEIRA, R.. Isolation and Partial Characterization of a Biosurfactant Produced by a *Streptococcus thermophilus* A. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 53: 105-112, 2006.

ROSA, P. T. V.; SANTANA, C. C.; CARBONELL, R. G. Determination of the liquid pool surfactant and protein concentration for semi-batch foam fractionation columns. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 24 (01): 01-14.

ROTH, C. M.; LENHOFF, A. M. Eletrostatic and Van der Waals Contributions to Protein Adsorption: Comparison of Theory and Experiment. **Langmuir**, 11: 3500-3509, 1995.

SANTOS, C. F. C. **Produção, Purificação e Caracterização de biossurfactantes produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis***. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001, 214 p.

SCHUCK, P.; MACPHEE, C. E.; HOWLETT, G. J. Determination of Sedimentation Coefficients for Small Peptides. **Biophysical Journal**, 74: 466-474, 1998.

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

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production.

Biochememical Engineering Journal, 21: 141-148, 2004.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin.

Process Biochemistry, 40: 2953-2958, 2005.

SHABTAI, Y.; GUTNICK, D. L. Enhanced Emulsan Production in Mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 selected for resistance to cetyltrimethylammonium bromide.

Applied Environmental Microbiology, 52: 146-151, 1986.

STAMATAKIS, K.; TIEN, C. Cake formation and growth in cake filtration.

Chemical Engineering Science, 46 (8): 1917-1933, 1991.

SULLIVAN, E.R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Current**

Opinion in Biotechnology, 9: 263-269, 1998.

SYMMANK H., FRANKE P., SAENGER W., BERNHARD F. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin syntetase.

Protein engineering, 15: 913-921, 2002.

THOMPSON, D.N.; FOX S.L.; BALA, G.A. Biosurfactants from potato process effluents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 84: 917-930, 2000.

TÓTH, Józseph. **Adsorption: theory, modeling, and analysis**. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2002.

TRAN-HÁ, M. H.; WILEY, D. E. The relationship between membrane cleaning efficiency and water quality. **Journal of Membrane Science**, 145: 99-110, 1998.

TSURGE K., OHATA Y., SHODA M. Gene yerP, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45: 3566-3573, 2001.

WIESMANN, U.; BINDER, H. Biomass separation from liquids by sedimentation and centrifugation. **Advances in Biochemical Engineering**, 1982.

WILLIS, M. S.; TOSUN, I. Rigorous cake filtration theory. **Chemical Engineering Science**, 35 (12): 2427-2438, 1980.

XIARCHOS, I.; DOULIA, D.; GEKAS, V.; TRÄGARDH, G. Polymeric Ultrafiltration Membranes and Surfactants. **Separation and Purification Reviews**, 32 (2): 215-278, 2003.

YAKIMOV, M. M.; GIULIANO, L.; TIMMIS, K. N.; GOLISHIN, P. N. Recombinant acylheptapeptide lychenisin: high level of production by *Bacillus subtilis* cells. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2 (2): 217-224, 2000.

YEH, M.S.; WEI, Yu-Hong; CHANG, Jo-Shu. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, 41: 1799-1805, 2006.

CAPÍTULO 2

RECUPERAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis*, UTILIZANDO ULTRAFILTRAÇÃO.

1. INTRODUÇÃO

Ultrafiltração molecular é uma forma de filtração onde moléculas são carregadas usando membranas onde os poros irão prevenir a passagem de solutos que possuam pesos moleculares na faixa de 10^2 Daltons, para maiores que 10^5 Daltons. A porção rejeitada é o retido, e o fluido que passa através da membrana é o permeado (RENNER & EL-SALAM, 1991). O fluxo aumenta conforme o aumento do tamanho dos poros, assim o peso molecular limite é selecionado como o maior possível enquanto ainda resultar em retenção de soluto. Ultrafiltração em escala laboratorial é tipicamente conduzida utilizando membranas de folha lisa, enquanto sistemas industriais utilizam pacotes de fibras ocas, ou membranas de folha lisa configuradas em pilhas, que liberam o fluxo de fluido para passar através das mesmas (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Relativamente, altas velocidades tangenciais de fluido são usadas em configurações de fluxos, a fim de minimizar o empilhamento de moléculas de soluto, próximas à superfície da membrana, que iriam, supostamente, restringir o fluxo (LADISH, 1992).

A ultrafiltração está sujeita à polarização de concentração, ou saturação da membrana, na qual o soluto rejeitado através da membrana causa um decréscimo no fluxo. Um decréscimo na porosidade efetiva da membrana é também causado por entupimento daqueles componentes adsorvidos na membrana (SABLANI et al, 2001; AGASHICHEV, 2006).

1.1. Biossurfactantes e Surfactina

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas por ano, sendo que a maior parte é utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico. (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Biossurfactantes 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. (DESAI & BANAT, 1997). São agrupados em glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lípideos neutros, compostos poliméricos e particulados (BIERMANN et al, 1987).

Os biossurfactantes, 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 (DESAI & BANAT, 1997; PEYPOUX et al, 1999). Uma das primeiras utilizações de biossurfactantes foi na área de biorremediação.

Toma-se como exemplo, o emprego de ramnolipídeos em biodegradação de contaminantes como hidrocarbonetos de petróleo, hidrocarbonetos polinucleares aromáticos, clorados, e metais pesados (MULLIGAN, 2005).

Recentes aplicações dos biossurfactantes remetem à sua atividade biológica e imunológica (NITSHCKE et al, 2004). Um exemplo é o dos glicolipídeos, moléculas que contém carboidratos em combinação com ácidos alifáticos de cadeia longa e hidróxiácidos alifáticos. Estes compostos revelaram capacidade de induzir a diferenciação celular em detrimento da proliferação de células leucêmicas. Lipopeptídeos podem agir como antibióticos, agentes antivirais e antitumorais, imunomoduladores ou toxinas específicas e inibidores enzimáticos. (CAMEOTRA & MAKKAR, 2004).

A indústria de surfactantes tem crescido a taxas muito altas, e a quantidade total de surfactantes produzidas em 2003, no mundo todo, tem sido estimada em cerca de 12 milhões de toneladas (MARTIN & BAKER, 2006).

Em 1968, Arima e colaboradores reportaram a presença de um composto biologicamente ativo no meio de cultura de *Bacillus subtilis*. Recebeu o nome de surfactina por sua excepcional atividade surfactante, e sua estrutura foi elucidada como sendo a de um lipopeptídeo.

Apesar de outros lipopeptídeos terem sido descobertos desde então, a surfactina apresenta-se como o principal representante da família, sendo o mais estudado. Investigações de suas outras atividades bioquímicas e fisiológicas revelam que a surfactina possui atividade antibacteriana, antitumoral e é agente hipocolesterolêmico (PEYPOUX et al, 1999). Experimentos *in vitro* mostram a

eficiência no tratamento antiviral e na utilidade posterior da surfactina em produtos biotecnológicos e farmacêuticos (VOLLENBROICH et al, 1997).

O potencial da surfactina como biossurfactante mostra-se satisfatório. A Concentração Micelar Crítica (CMC), ou eficiência de um surfactante, fica por volta de 25 mg/L, e a tensão superficial, ou energia necessária para perturbar uma superfície, chega a 25 mN/m. (NITSCHKE, 2004).

1.2. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais

Geralmente, a maioria dos resíduos gerados em indústrias de alimentos é dispensada e causam danos ao ambiente. Logo, a utilização de tais resíduos faz-se necessária, já que muitos deles mostraram-se adequados à utilização em bioprocessos. A redução dos custos na produção de biossurfactantes 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 alvo, para melhorar a relação custo-benefício ao final do mesmo (COSTA, 2005). No caso da produção biotecnológica de surfactantes, a utilização de resíduos de alto conteúdo de carboidratos e lipídeos parece ser uma opção adequada (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002).

A mandioca é usada no Brasil diretamente na alimentação, ou é utilizada para a produção de farinha e fécula. Os resíduos do processo industrial são líquidos e sólidos que, sem tratamento, causam fortes impactos ambientais. Isto se deve à alta quantidade de matéria orgânica e a presença de compostos tóxicos. A manipueira consiste na água de constituição da mandioca, extraída na

prensagem da massa ralada, durante a produção de farinha. Ocorre, na produção, a geração de cerca de 300 L de manipueira por tonelada de raiz processada. Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization) aproximadamente 36 milhões de toneladas de mandioca são produzidas na América do Sul, sendo 26 milhões de toneladas no Brasil. O potencial poluidor da manipueira é extremamente alto. (NITSCHKE, 2004).

Várias linhagens de *Bacillus subtilis* foram testadas segundo suas habilidades em utilizar a manipueira para a produção de surfactina (NITSCHKE et al., 2004). Comparativamente, para todas as linhagens, a manipueira foi o meio de cultura que gerou as menores tensões superficiais, com valores próximos de 26 mN/m, sendo considerada o meio mais adequado para o desenvolvimento das linhagens testadas de produção de biossurfactante.

1.3. Processo Fermentativo

Atualmente, a produção de biossurfactante estende-se na área de fermentação em escala laboratorial e semi-piloto (COSTA, 2005; BARROS, 2007). A cinética de produção de biossurfactante apresenta mudanças entre os mais variados sistemas.

Existem fatores determinantes na produção dos biossurfactantes, tais como a fonte de carbono, fonte de nitrogênio, e fatores ambientais. Fontes de carbono solúveis em água tais como glicerol, glicose, manitol e etanol são muito utilizados para produção de ramnolipídeo. Demonstrou-se também que diferentes fontes de carbono no meio influenciam a produção de biossurfactante. Meios constituintes

de outras fontes além da de carbono também afetam a produção de biossurfactantes. Entre os sais inorgânicos testados, sais de amônio e uréia são as fontes preferidas de nitrogênio, por exemplo, para produção de biossurfactante de *Arthrobacter parafineus*, enquanto que a estrutura da surfactina é influenciada pela concentração de L-aminoácidos no meio para produção de seus aminoácidos Valina ou Leucina. (DESAI & BANAT, 1997).

Fatores ambientais e condições de crescimento como pH, temperatura, agitação, e disponibilidade de oxigênio, também afetam a produção de biossurfactante, através de seus efeitos no crescimento e atividade celular (PEYPOUX et al, 1999). O pH do meio representa um importante papel na produção de soforolípido, ramnolípido e surfactina. Tratamentos com calor em alguns biossurfactantes não causaram mudanças apreciáveis em suas propriedades, tais como abaixamento das tensões superficial e interfacial, e a eficiência na emulsificação, e todos se mostraram estáveis depois de autoclavagem a 121°C (BARROS, 2007).

O processo de fermentação de manipueira para produção de surfactina de *Bacillus subtilis* tem passado por várias etapas de padronização e otimização (BARROS, 2007). Cada vez mais estudos nutricionais e de produção são feitos com culturas fermentativas, geralmente em frascos do tipo erlenmeyer, mas ocasionalmente em fermentadores de pequena e larga escala (NITSCHKE, 2004; COSTA, 2005; BARROS, 2007).

Para controle de parâmetros como contagem de células viáveis, pH do meio, produção de espuma e concentração de carboidratos, já foi reproduzido o processo fermentador de bancada (COSTA, 2005; BARROS, 2007).

1.4. Extração e Purificação de Biossurfactantes

A surfactina é extraída do meio de cultura por clássicos métodos. As técnicas de recuperação de biossurfactantes mais comuns são: precipitação (com sulfato de amônio, acetona, ácida), extração com solventes orgânicos e cristalização, para processos em batelada; centrifugação, adsorção separação de espuma e precipitação, filtração com escoamento tangencial, diafiltração e precipitação, e ultrafiltração, para processos contínuos. Surfactina e similares biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, respectivamente, são recuperados por precipitação ácida, enquanto que aqueles produzidos por *Pseudomonas* spp são recuperados por precipitação com acetona. (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Impurezas são coextraídas, o que faz com que se lance mão de extração por procedimentos cromatográficos.

Entretanto, para purificar e concentrar este lipopeptídeo, muitos autores adotaram métodos de apenas um passo, incluindo extração em duas fases, ultrafiltração, e extração em fase sólida. A técnica de fracionamento da espuma é também de grande interesse e oferece dupla vantagem por remover continuamente *in situ* a surfactina do caldo fermentativo e prevenir uma possível inibição por 'feed-back'. (PEYPOUX et al, 1999).

A recuperação e purificação de biossurfactantes do complexo caldo fermentativo tem se tornado uma barreira na comercialização deste tipo de produto (LIN & JIANG, 1997). O processo de separação por membranas é também bem visto nos passos de 'downstream' que envolvem o processo de

recuperação, concentração e purificação das biomoléculas (SEN & SWAMINATHAN, 2005).

O processo de 'downstream' em muitos processos biotecnológicos é responsável por mais de 60% do custo de produção total. Por razões econômicas, a maioria dos biossurfactantes envolve custos atribuídos aos meios de cultura celulares e outras preparações. Além disso, a atividade biossurfactante deve ser afetada por outros materiais presentes nestas preparações. A recuperação de um biossurfactante depende principalmente da suas cargas iônicas, solubilidade em água, e localização (intra ou extracelular, ou entre camadas) (LADISCH, 2001).

Em recentes descobertas, a remoção contínua de biossurfactantes durante a fermentação por diferentes técnicas aumentou a densidade celular no reator e eliminou a inibição de produto, resultando num aumento do rendimento de biossurfactante. Ainda, reduções substanciais no custo de recuperação do produto e tratamento de efluentes foram constatadas. Uma das técnicas mais bem sucedidas envolve a remoção in situ da surfactina do caldo de fermentação por fracionamento da espuma (DAVIS, 2001; BARROS, 2007). Nessa técnica, a espuma é coletada e acidificada a pH 2,0 com HCl concentrado, e a surfactina precipitada é extraída em diclorometano (PEYPOUX et al, 1999; SEN & SWAMINATHAN, 2005).

Cada etapa da extração do biossurfactante produzido depende da sua estrutura e propriedades onde muitos métodos efetivos para um tipo de biossurfactante se mostram ineficientes para outros. No caso da surfactina, biossurfactante produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*, primeiro separa-se as células do sobrenadante. Posteriormente, utiliza-se precipitação ácida com HCl,

seguida de extração com solventes, como metanol ou diclorometano, ou ainda fracionamento de espuma seguida de ultrafiltração utilizando membranas de diferentes pesos moleculares. (SANTOS, 2001).

A ultrafiltração atualmente é utilizada, em testes laboratoriais, para a separação de biossurfactantes do meio de fermentação, como no caso dos glicolipídeos, utilizando a capacidade dos biossurfactantes em formar micelas ou agregados acima da CMC, que podem ser retidos em membranas de exclusão de alto peso molecular. Para extração em larga escala ou para o isolamento contínuo de surfactantes do meio de fermentação também são relatadas as técnicas de cromatografia de adsorção, troca iônica, e para sua purificação, HPLC e filtração em gel. (NITSCHKE, 2004).

Para LIN et al (1997), no caso da surfactina de *Bacillus subtilis*, devem ser levados em conta alguns aspectos. A produção ocorre na forma de estruturas supramoleculares, tais como micelas ou vesículas. A ultrafiltração deve sofrer um pré-tratamento, uma centrifugação pós-fermentação de 12000 G por 10 minutos.

O tratamento principal é feito numa célula de ultrafiltração, com membranas de celulose. Neste caso, as duas membranas foram as de retenção de moléculas acima de 10 KDa e 30 KDa respectivamente, e uma variação de pressão de $6,9 \times 10^4$ Pa a $2,1 \times 10^5$ Pa.

A membrana permeia moléculas menores, e retém as surfactinas organizadas em micelas. Assim, a filtração pôde ser dividida em duas etapas:

filtração das micelas, onde o fator de retenção (surfactina no retido/surfactina total) foi de 98,8% para a membrana de 10 KDa e 97,9% para a membrana de 30 KDa.

filtração extra: as micelas de surfactina são dissociadas com metanol, e filtradas com a intenção de serem permeadas. As proteínas solúveis, por serem maiores, ficam retidas.

Após secagem a vácuo, o rendimento final foi de 95%. Foram realizadas análises em HPLC na cultura pós-centrifugação/pré-ultrafiltração.

MULLIGAN & GIBBS (1990) também utilizou parâmetros semelhantes, como por exemplo centrifugação 12000 G por 10 minutos. Porém, neste caso, foram realizados testes com ultrafiltração em membranas de 10, 30, 50, 100 e 300 KDa, a uma pressão de 172 KPa. São necessárias análises de tensão superficial, CMC e concentração de aminoácidos. A quantidade de surfactina (concentração) foi determinada por análise de aminoácidos. O cálculo baseia-se concentração lipopeptídica, multiplicada pelo peso molecular.

O trabalho mostrou resultados satisfatórios, como por exemplo, 10 cm³ concentrados em 1 cm³, para cada caso, sendo que a retenção maior ocorreu nas três membranas de menor peso molecular. Isso mostra que uma micela pode conter de 50 a 100 moléculas de surfactina. Os permeados contém moléculas não-agregadas de surfactina. A CMC foi de 0,025 g/dm³. A retenção de impurezas como aminoácidos (treonina, serina, glicina e alanina) diminui conforme aumenta o peso molecular limite de permeabilidade das membranas. Outras impurezas verificadas: glicose (10 g/dm³) e fosfato inorgânico (4,2 g/dm³) no meio de crescimento. Quantidades insignificantes de glicose e 10% de fosfato foram retidas por cada uma das membranas.

Para experimento em larga escala foram utilizados 7 dm³, passando pela membrana de 30 KDa. Retenção de 90% de surfactina e concentração obtida de

51,8 g/dm³, e pureza de 52,6%, maior que aquela purificada quimicamente (31,6%). A estrutura da surfactina foi confirmada por espectrometria de massas, com o íon protonado molecular sendo detectado a M/Z = 1037, ou seja, o peso molecular da surfactina está por volta de 1037 Da.

Num fator de purificação igual a 10, a viscosidade da surfactina não varia significativamente. Já num fator igual a 160, a viscosidade torna-se significativa (4,1 cP a 51,8 g/dm³), retardando a taxa de filtração. Por isso, a concentração de surfactina deve ser limitada a 20 g/dm³. Os custos são reduzidos quando grandes volumes de solvente não são usados. Em termos de tempo, a ultrafiltração leva somente 2% do tempo que leva uma purificação química.

Para SEN & SWAMINATHAN (2005), no caso de moléculas de 10 A° a 500-1000 A° de diâmetro, a ultrafiltração mostra ser uma boa alternativa. Neste caso a espuma foi agregada da fermentação e misturada a 200 mL do caldo fermentativo, e centrifugada para remoção de células por precipitação.

Na ultrafiltração, o fluxo tem uma região pressão-dependente, seguida de uma região pressão-independente, com a operação se movendo do controle da membrana para o controle do gel. A rejeição observada do soluto tipicamente decresce com o gradiente de pressão, ao passo que a polarização aumenta. A membrana usada foi uma de 50 KDa. O efeito do pH na solução de surfactina no fluxo de permeado foi avaliado.

Segundo os resultados, a pressão transmembrana realiza papel importante na desempenho da membrana. O máximo fluxo de permeado obtido foi a um pH de 8,5, numa concentração de 1 g/L, sendo este pH, portanto, o ótimo para máxima retenção de surfactina.

O fluxo máximo de permeado foi obtido na diluição 1:10. A região pré-gel foi restrita a concentrações de surfactina abaixo de 0,5 g/L. A retenção de surfactina foi por volta de 98,5%, sendo todos os experimentos feitos a uma velocidade moderada.

O grau de pureza da surfactina separada por membrana foi maior (70%) que a surfactina quimicamente purificada (32,1%). Membranas de ultrafiltração com peso molecular de duas ordens de magnitude maiores que o peso molecular do biossurfactante podem ser eficientemente utilizadas para concentração e purificação de micelas agregadas de mais de 50 moléculas de surfactina, formadas abaixo da CMC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção de espuma

A espuma que contém o biossurfactante foi produzida em fermentador piloto marca Pilot New Brunswick 8000 MP 80 (New Brunswick Scientific, USA), de capacidade 80 litros, localizado no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da Universidade Estadual de Campinas. O inóculo continha cepas de *Bacillus subtilis* Lb5a (Laboratório de Bioaromas - Unicamp, Brasil). Alçadas foram transferidas para um erlenmeyer de 250 ml contendo 150 ml de caldo nutriente, sendo então incubada a 30°C por 12h em banho com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi

homogeneizada, 5 ml foram transferidos para cada um dos 24 erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de caldo nutriente e incubadas a 30°C em banho com agitação de 150 rpm por 8 horas.

O inóculo foi padronizado através da verificação da densidade ótica ($\lambda = 610\text{nm}$) da mistura de 10 alíquotas de mesmo volume retiradas diferentes erlenmeyers tomados aleatoriamente. A partir do resultado de absorbância, e considerando uma curva padrão de concentração celular x densidade ótica, foram tomados um número de frascos com 100ml da cultura de forma que houvesse quantidade de células suficiente para igual densidade celular em todas as bateladas (2×10^7 UFC/ml). O substrato utilizado foi a manipueira, devidamente tratada segundo as condições relatadas por Barros (2007), ou seja, fervura da manipueira a temperatura de 100°C, e centrifugação da mesma em Centrífuga contínua. À manipueira, foi adicionada água destilada na proporção de 9 partes de manipueira para 1 parte de água destilada, totalizando um volume de 40 litros de substrato.

O fermentador trabalhou sob agitação constante de 150 rpm e aeração de 15 L/h. A fermentação durou 60 horas, e, à medida que a aeração do sistema produzia a espuma, a mesma era coletada por um sistema acoplado ao fermentador de mangueira e frascos de erlenmeyer, também segundo metodologia de Barros (2007). A espuma, após ser coletada, entra em colapso, e acaba gerando um líquido que contém uma alta concentração de biossurfactante, bem como outros metabólitos secundários, gerados pelo metabolismo da bactéria *Bacillus subtilis*, além de restos celulares do próprio microrganismo. A espuma

contém uma alta concentração de biossurfactantes, em relação ao mosto fermentativo, sendo misturada em um único recipiente, possibilitando a análise em um único lote.

2.2. Pré-tratamento da espuma

A espuma produzida por fermentação foi previamente preparada para passar pelo processo de ultrafiltração. Foi realizada centrifugação em equipamento da marca Beckman (Modelo J 21, Beckman, USA), a uma velocidade de 10000 rpm, por um período de 10 minutos. A centrifugação é utilizada para eliminação dos restos celulares presentes na espuma (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Após centrifugação a espuma é armazenada em temperatura de congelamento, a fim de garantir que não ocorra crescimento celular.

2.3. Processo de ultrafiltração

O processo foi conduzido com um volume de 3 L de espuma, armazenada em béquer comum. O equipamento utilizado é um módulo de ultrafiltração Pellicon 2 (Millipore, USA), com membranas empacotadas de 0,5 m² de área filtrante, e peso molecular limite de membrana (MWCO ou Molecular Weight Cut-Off) de 30 KDa. O módulo também vem acompanhado de uma bomba peristáltica, com capacidade de vazão de até 10 L/min. Os seguintes parâmetros foram controlados constantemente durante o processo: temperatura à 25 °C, pressão de alimentação a 25 psi, pressão de saída de retido a 15 psi.

O módulo possui 3 mangueiras de borracha, correspondentes a alimentação, saída de permeado e saída de retido, respectivamente. A alimentação foi, portanto, conectada ao bécquer contendo a espuma, bem como a saída de retido. O objetivo foi fazer o reciclo do sistema, a fim de se conseguir uma maior concentração de biossurfactante na espuma ultrafiltrada. À saída de permeado, foi conectada uma proveta graduada para determinação da vazão de permeado. A Figura 01 mostra o sistema de ultrafiltração.

O processo foi conduzido da seguinte maneira: inicialmente, o sistema foi ligado com reciclo total, ou seja, toda a espuma circulava através das membranas, e posteriormente, os parâmetros foram ajustados a fim de condicionar o sistema a funcionar dentro do especificado. Assim, foi dada a partida no processo, marcando o tempo, e acoplando a saída de permeado a proveta graduada. O processo transcorria até o tempo de 25 minutos. Após o tempo determinado, o sistema foi desfeito.



Figura 01 – Imagem ilustrativa do sistema de ultrafiltração.

No tempo zero, a amostra considerada inicial foi coletada. A cada minuto par, eram coletadas amostras do retido resultante, e a cada minuto ímpar as amostras coletadas eram as de permeado, em pequenos recipientes de plástico.

As amostras coletadas durante o processo foram pesadas e, ao final do processo, as amostras totais de permeado e de retido foram devidamente pesadas e armazenadas em temperatura de congelamento.

2.4. Análises da solução ultrafiltrada

As amostras de permeado e de retido, retiradas nos intervalos de tempo especificados no item anterior, passaram por uma análise de tensão superficial, seguindo o método da placa, em tensiômetro modelo K-12 (Krüss, Alemanha), sendo que as amostras de retido ainda passaram por diluições de 10 e 100 vezes, a fim de se medir a tensão superficial nessas concentrações. O objetivo foi a determinação, através desse método, da Concentração Micelar Diluída (CMD).

As amostras de retido passaram posteriormente por análises de sólidos totais pelo método da gravimetria. As amostras foram inseridas em cadinhos de porcelana, devidamente secos e pesados em balança analítica da marca Explorer (Ohaus Corporation, USA). Posteriormente foram colocadas em estufa de secagem modelo Orion[®] (Fanem, Brasil) a uma temperatura de 50 °C, até que o peso das amostras secas fosse constante.

Precipitação ácida e extração com solvente: Foi coletada amostra de 50 mL da espuma inicial, pós-centrifugada e pré-ultrafiltração, e 50 mL da porção retida para purificação. Inicialmente, aproveitando as características dos biossurfactantes de precipitarem a pHs extremos, foi adicionado HCl 6M para diminuir o valor de pH das amostras. Ocorreu a precipitação das amostras, que posteriormente, foram levadas à centrifugação em equipamento modelo Allegra[®]

64R (Beckman, USA), nas condições de velocidade de 10000 rpm num tempo de 20 minutos, à temperatura de 4 °C (BARROS, 2007). Após a centrifugação, as amostras precipitadas foram coletadas com o auxílio de água destilada, passando por um descanso de 12 horas, em refrigeração a 5 °C.

Dando seguimento ao processo, as amostras tiveram seu valor de pH neutralizado, ou seja, o pH ficou próximo de 7, com o auxílio de solução de NaOH 0,1 M. Assim, os biossurfactantes voltaram a solubilidade em água e foram dissolvidos na solução. Em seguida, as amostras foram levadas em estufa (50°C) para secagem, e após secas, foram extraídas com solvente contendo Clorofórmio e Metanol, na proporção 65:15 respectivamente. Com a extração e posterior filtragem em filtros de papel, as amostras semipurificadas foram pesadas em balança analítica, a fim de se determinar seu grau de semipurificação.

Construção da curva de calibração: a curva de calibração foi construída com base em curvas semelhantes de trabalhos anteriores (SEN & SWAMINATHAN, 2005; BARROS, 2007). Como substância padrão, foram utilizados 5 mg de Surfactina 98 % de pureza (Sigma, USA), diluídos em 500 mL de água Milli-Q[®] (Millipore, USA), formando assim uma solução-mãe de concentração 10 mg/L. Partindo desta solução-mãe, foram feitas amostras diluídas de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 e 1 mg/L de concentração. Após armazenadas, foram realizadas medidas de tensão superficial em cada amostra, em tensiômetro, pelo método da placa, cujos dados geraram uma curva de calibração de Tensão Superficial vs. Concentração de Surfactina 98%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Curva-padrão de Surfactina

A Figura 02 mostra a curva de calibração padrão de Surfactina da marca Sigma[®], com grau de pureza de 98%.

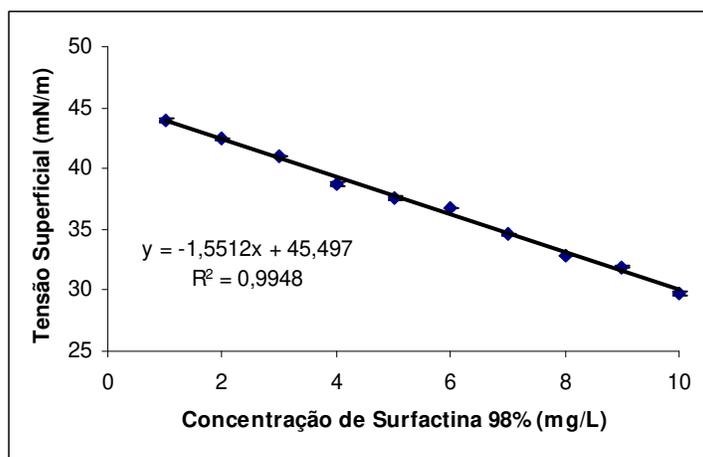


Figura 02 – Curva de calibração padrão da tensão superficial em relação à concentração de Surfactina 98%[®].

A curva de calibração foi obtida baseada nas determinações de concentração micelar crítica (CMC), geralmente aplicadas para biossurfactantes (SEN & SWAMINATHAN, 2005). A faixa determinada foi escolhida devido a uma característica singular dessa região específica da curva de CMC, a diminuição linear da tensão superficial em função da concentração da solução de surfactina. Os dados dessa curva foram utilizados para determinação indireta da concentração de surfactina das amostras de retido, obtidas na ultrafiltração.

3.2. Caracterização do Processo

O processo de ultrafiltração foi aplicado para concentração e purificação de biossurfactante fixando-se as variáveis importantes de processo, como Pressão Transmembrana, Temperatura e Tempo de Processo. Os valores de Pressão Transmembrana, a 15 psi, Temperatura a 25° C, e Tempo de Processo de 25 minutos foram baseados em experimentos anteriores (MULLIGAN & GIBBS, 1990; LIN et al, 1997; SEN & SWAMINATHAN, 2005), bem como na capacidade do equipamento e volume de espuma de fermentação disponível.

Um volume de 3 litros de espuma centrifugada foi concentrado, em média, a 11,5% de seu volume inicial, obtendo-se um fator de concentração igual a 9,0. O percentual é considerado muito bom, levando-se em conta que este volume ainda está aquém da capacidade limite do equipamento.

Nem todas as moléculas de surfactina estão agregadas em micelas, e com isso, devido ao peso molecular da molécula ser mais baixo que o peso molecular limite de membrana (a surfactina pesa cerca de 1040 Daltons), as moléculas livres acabam sendo permeadas, causando assim uma pequena perda durante o processo. A Figura 03 mostra o comportamento da solução, durante o tempo de processo, nas porções de permeado e de retido. Estão relacionadas as concentrações de biossurfactante presentes em ambas porções, e verifica-se que os valores de concentração da porção de permeado são muito menores que os de retido, cabendo ainda ressaltar que a concentração na porção retida é bem maior que a concentração micelar crítica do biossurfactante.

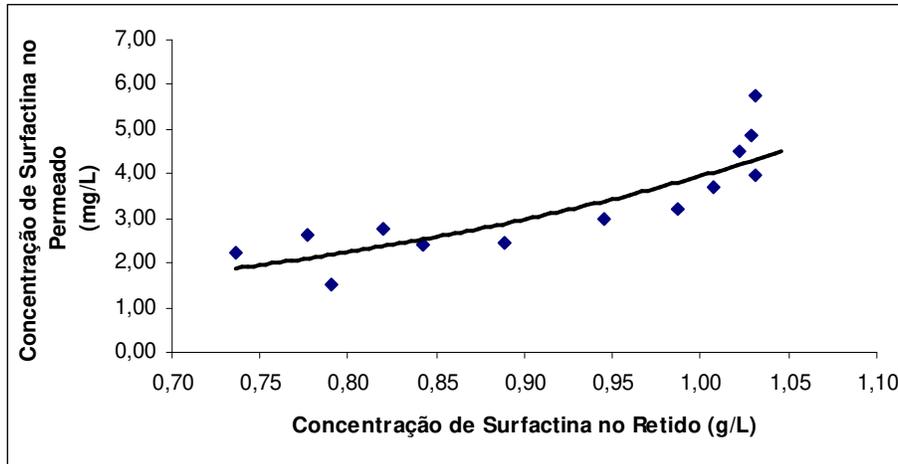


Figura 03 –. Relação entre as concentrações de Permeado (em mg/L) e de Retido (em g/L).

Em concentrações micelares pouco maiores que 1 g/L na porção retida, a concentração de biossurfactante no permeado começa a aumentar, sugerindo que agregados submicelares são formados na porção de permeado, sendo tais complexos suficientemente menores para serem permeados pela membrana.

Esse comportamento evidencia-se na efetividade do processo, mostrada na Figura 04. A relação entre o fluxo de permeado e a concentração de biossurfactante na porção retida mostra que, à medida que ocorre a concentração de biossurfactante na porção retida, o fluxo de permeado vai decrescendo. Extrapolando-se a relação linear formada, onde o fluxo de permeado cessa e chega a zero, ocorre o que pode ser chamado de “ponto de gel”, ou seja, a maior concentração de biossurfactante que pode ser obtida ao final do processo (CHRISTIAN & SCAMEHORN, 1989). Nesse caso, a maior concentração obtida no experimento foi de 1,08 g/L.

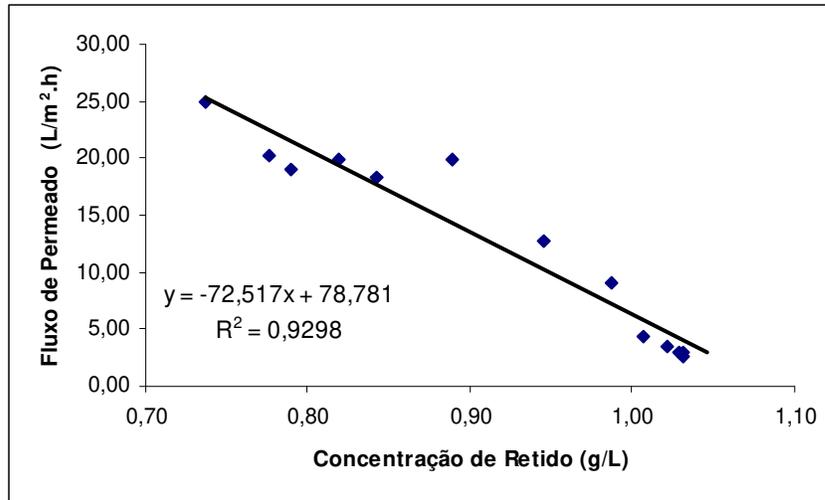


Figura 04 – Fluxo de permeado em função da concentração de retido.

As concentrações de biossurfactante no retido e no permeado puderam ser calculadas em função das medidas de tensão superficial, da análise indireta através da curva-padrão, da análise de sólidos totais e da metodologia de semipurificação por precipitação ácida e extração por solvente orgânico. Os resultados de tensão superficial para as porções de permeado e retido estão na Figura 05.

As amostras de retido ainda foram analisadas em função de suas concentrações micelares diluídas (CMD), 10 vezes e 100 vezes. Pode-se observar que existe uma grande diferença entre os valores de tensão superficial das amostras de permeado e as amostras de retido, puras, e nas diferentes diluições.

No caso das amostras de permeado, a faixa de tensão superficial observada indica que existe uma pequena concentração de biossurfactantes presentes, pois os valores estão bem acima dos valores de tensão superficial dos biossurfactantes em suas concentrações micelares críticas (CMC) que atingem tensões na faixa de 25 a 27,5 mN/m (SEN & SWAMINATHAN, 2005; COSTA,

2005; BARROS, 2007). Abaixo da CMC, as moléculas de biossurfactante encontram-se dispersas na solução, aumentando, portanto, os valores de tensão superficial.

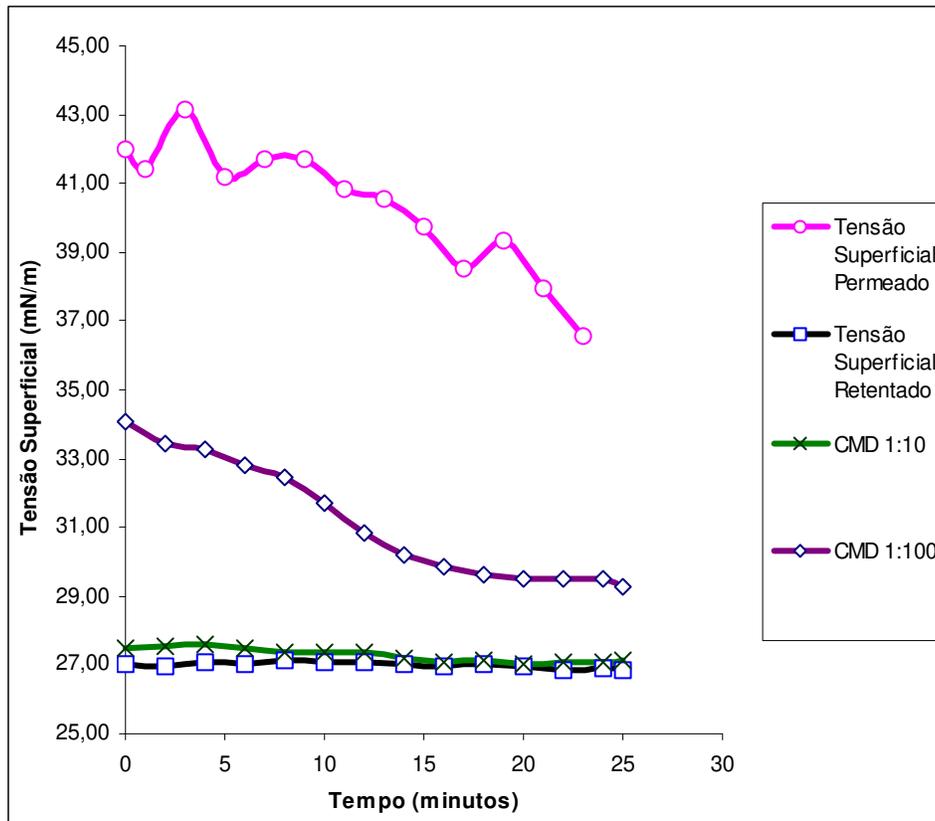


Figura 05 – Análise das tensões superficiais das amostras de permeado e de retido.

Os valores de tensão superficial, encontrados nas amostras de retido, mostram que a concentração de biossurfactantes presente é alta, e acima da CMC, pois tanto os valores de tensão das amostras de retido puras, como as amostras de retido na CMD 10 vezes, apresentam valores de tensão muito próximos, com tendência a se igualarem, e estáveis a uma estreita faixa próxima dos 27 mN/m durante todo o tempo de processo. Já os valores de tensão das

amostras de retido na CMD 100 vezes começam abaixo da CMC e a ultrapassam com o passar do tempo. A redução da tensão superficial com valores atingindo 29 mN/m no final do processo, mostra que o mesmo está concentrando biossurfactantes significativamente, pois os valores de CMD 100 vezes tendem a se aproximar dos valores estáveis de amostras de retido puras e com CMD 10 vezes.

A Tabela 01 seguinte mostra os valores de concentração indireta de surfactina, calculada a partir da curva de calibração padrão da Figura 02, bem como os valores de concentração de sólidos totais e sua relação com a concentração de surfactina presente, sendo possível assim determinar indiretamente o grau de pureza das amostras.

Para o cálculo das amostras que apresentaram valores de tensão superficial fora da curva de calibração, foram necessárias novas diluições para análise de novas tensões. No caso específico da tabela abaixo, os cinco últimos valores estão fora da curva. Portanto, a estes valores foi aplicada uma CMD de 150 vezes, sendo os valores de tensão medidos posteriormente. Os resultados foram valores de tensão dentro da curva, podendo assim se fazer a conversão para valores de concentração de surfactina.

A análise de sólidos totais revelou que com o passar do tempo as moléculas vão se concentrando em um volume cada vez menor, ocorrendo portanto a concentração de todas as moléculas acima do peso molecular limite da membrana, e assim das micelas de biossurfactante.

Tabela 01 – Valores de Tensão Superficial de amostras de retido na Concentração Micelar Diluída 100 vezes, Concentração indireta de Surfactina pura (pureza 98%), estimada pela curva de calibração padrão, Concentração de sólidos totais e Relação da Concentração de Surfactina com a Concentração de Sólidos Totais.

Tempo (minutos)	Tensão Superficial de retido na CMD de 100 vezes	Concentração Surfactina (g/L)	Concentração de sólidos totais (g/L)	Relação Surfactina/Concentração de Sólidos totais (%)
0,00	34,07	0,74	26,34	2,13
2,00	33,45	0,78	30,26	2,69
4,00	33,24	0,79	31,58	2,62
6,00	32,78	0,82	33,49	2,46
8,00	32,43	0,84	32,26	2,71
10,00	31,71	0,89	32,26	2,93
12,00	30,83	0,95	34,74	2,86
14,00	30,19	0,99	33,66	3,39
16,00	29,88	1,01	36,38	3,21
18,00	29,65	1,02	41,58	2,52
20,00	29,50	1,03	42,77	2,48
22,00	29,53	1,03	45,12	2,37
24,00	29,50	1,03	46,28	2,32
25,00	29,28	1,05	52,57	3,21

Com perdas pouco significativas, na Figura 06 observa-se que a concentração de Surfactina aumenta juntamente com a concentração de sólidos totais durante o tempo de processo. Além disso, a taxa de concentração de Surfactina é ligeiramente maior que a taxa de concentração de sólidos totais, o que indica uma tendência deste processo à purificação dos biossurfactantes presentes. Este fato foi comprovado também em trabalhos anteriores (LIN et al, 1997).

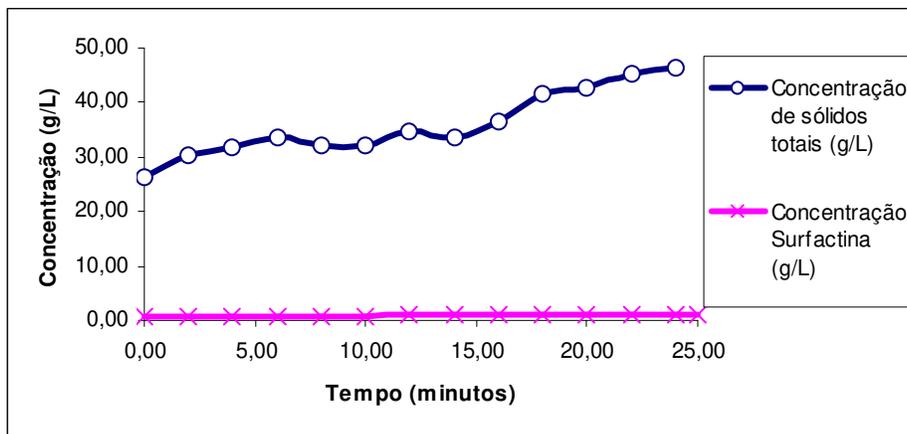


Figura 06 – Variação das concentrações de Sólidos Totais e de Surfactina durante o processo.

Possíveis impurezas encontradas provêm de produtos de metabolismo da bactéria *Bacillus subtilis* como, por exemplo, peptídeos, proteínas e cadeias carbônicas (PEYPOUX et al, 1999). Algumas, por serem de peso molecular menor que o peso molecular limite de membrana são permeadas, porém muitas moléculas ainda resistem e vão se aglomerando juntamente com as moléculas de biossurfactante, causando um aumento significativo de viscosidade. Esse aumento de viscosidade é um fator limitante do processo, pois a alta concentração de biossurfactante e suas impurezas levam à formação de camada de gel na superfície da membrana, causando o entupimento da membrana, e a impraticabilidade do processo.

A rejeição da membrana foi calculada a partir das concentrações indiretas de surfactina, presentes no permeado e no retido, ficando em torno de 0,995 em todos os intervalos de tempo do processo, o que demonstra a eficiência do processo em reter provavelmente, e praticamente, a maioria das moléculas de surfactina, presentes na forma de micelas e acima de 30 kDa.

Pode-se dizer que em todo o volume de retido obtido, consta a maior parte das moléculas de biossurfactante, pois numa concentração inicial de espuma semi-purificada igual a 1,85 g/L, o equilíbrio micelar das moléculas de surfactina é termodinamicamente favorável, com alguns “monômeros” permanecendo livres, agregando portanto a maior parte das moléculas, pois as micelas formadas possuem peso molecular entre 50 kDa e 100 kDa, ou seja, 50 a 100 moléculas de surfactina (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Assim, a eliminação das moléculas inferiores ao peso molecular limite de membrana faz com que a concentração de biossurfactantes e, portanto da molécula de surfactina, aumente com o decorrer do tempo.

4. CONCLUSÃO

O processo de ultrafiltração para concentração de biossurfactante mostra-se muito eficiente, porém existem limites de concentração neste tipo de processo, pois um aumento da concentração gera um aumento na viscosidade da solução ultrafiltrada, dificultando o processo e podendo comprometer a membrana utilizada, com problemas como entupimento dos poros.

A análise de tensão superficial é um parâmetro importante e relativamente fácil de ser obtido para a determinação de biossurfactantes presentes no processo de ultrafiltração. Cabe a observação que os biossurfactantes reduzem drasticamente a tensão superficial em relação à tensão superficial da água, porém proteínas também reduzem a tensão superficial de líquidos em relação a água, podendo interferir na determinação indireta da concentração de surfactina pela

curva padrão, a concentrações mais baixas, mais especificamente abaixo da CMC. Porém para altas concentrações ou concentrações acima da CMC, a tensão superficial é um ótimo parâmetro.

A metodologia de purificação por precipitação ácida e extração com solvente orgânico também é um parâmetro fácil de ser obtido, e, portanto, muito útil na determinação rápida da concentração de soluções que contenham biossurfactantes.

Os valores de concentração de sólidos totais e de surfactina mostram um aumento, dando ao processo uma característica otimista. A taxa de crescimento da concentração de surfactina, apesar de ser ligeiramente maior que a taxa de crescimento da concentração de sólidos totais, praticamente acompanha esta, indicando que o processo é eficiente em termos de concentração, porém não é eficiente em termos de purificação do biossurfactante desejado, sendo necessários outros processos para melhoramento dessa etapa. Tais processos podem utilizar inclusive a ultrafiltração como sub-etapa, uma ou demais vezes, e, neste caso, altos rendimentos em termos de concentração e purificação de biossurfactantes podem ser obtidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGASHICHEV, S. Enhancement of concentration polarization due the gel accumulated at membrane surface. **Journal of Membrane Science**, 285 (1-2): 96-101, 2006.

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.

BARROS, F. F. C. **Estudo das Variáveis de Processo e Ampliação de Escala na Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* em Manipueira.** Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007, 102 p.

BIERMANN, M.; LANGE, F.; PIORR, R.; PLOOG, U.; RUTZEN, H.; SHINDLER, J.; SHIMIDT, R. Em: FALBE, J. (Ed.), **Surfactants in Consumer Products, Theory, Technology and Application.** Springer-Verlag, Heidelberg, 1987.

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.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**. 7:262-266, 2004.

COSTA, G. A. N. **Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações**. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005, 87p.

CHRISTIAN, S. D.; SCAMEHORN, J. F. Use of Micellar-Enhanced Ultrafiltration to Remove Dissolved Organics from Aqueous Streams. **Surfactant-Based Separation Process**, surfactant science series, volume 33. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1989.

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.

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

LADISCH, M. R. **Bioseparations Engineering - Principles, Praticce and Economics**. John Wiley & Sons, New York, USA, 2001.

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.

LIN, S. C.; CHEN, Y. C.; LIN, Y. M. General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactants analysis and purification. **Journal of Chromatography A**, 825: 149-159, 1998.

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.

MARTIN, P. J. ; BAKER, S. C. **A Novel Process for the Continuous Production of Surfactin**. Engennering and Physical Sciences Research Council. University of Oxford, 2006.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications of biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133: 183-198, 2005.

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

NITSCHKE, M. **Produção e Caracterização de Biossurfactante de *Bacillus subtilis* Utilizando Manipueira como Substrato**. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004, 88p.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova** 25(5): 772-776, 2002.

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

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

RENNER, E.; EL-SALAM, M. H. A. **Application of ultrafiltration in the dairy industry**. Elsevier Applied Science, New York, USA, 1991.

SABLANI, S.; GOOSEN, M.; AL-BELUSHI, R.; WILF, M. Concentration Polarization in Ultrafiltration and Reverse Osmosis: a Critical Review. **Desalination**, 141 (3): 269-289, 2001.

SANTOS, C. F. C. **Produção, Purificação e Caracterização de biossurfactantes produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis***. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001, 214p.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, 40: 2953-2958, 2005.

TRAN-HÁ, M. H.; WILEY, D. E. The relationship between membrane cleaning efficiency and water quality. **Journal of Membrane Science**, 145: 99-110, 1998.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(1): 44-49, 1997.

XIARCHOS, I.; DOULIA, D.; GEKAS, V.; TRÄGARDH, G. Polymeric Ultrafiltration Membranes and Surfactants. **Separation and Purification Reviews**, 32(2): 215-278, 2003.

DIAFILTRAÇÃO UTILIZADA NA RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE *Bacillus subtilis*.

1. INTRODUÇÃO

Os processos de downstream para recuperação de bioprodutos geralmente são responsáveis por aproximadamente 60% do custo total de produção (MUKHERJEE et al, 2006). No campo dos biossurfactantes, esta afirmação também é válida, uma vez que tais moléculas, por serem produtos de metabolismo secundário de microrganismos, possuem uma grande dificuldade de serem obtidos em suas formas mais puras possíveis.

Os biossurfactantes são moléculas de característica anfifílica, ou seja, possuem uma porção hidrofílica (polar), e hidrofóbica (apolar). Além disso, outros fatores preponderantes quando da recuperação de tais produtos é a grande capacidade de reduzir a tensão superficial em meio líquido, bem como a capacidade de formação de micelas ou vesículas (DESAI & BANAT, 1997).

Todos os processos empregados na recuperação de biossurfactantes procuram tirar vantagem das propriedades citadas acima. Muitos métodos de recuperação, concentração e purificação de biossurfactantes foram reportados na literatura, sempre lidando com o processo inicialmente em escala laboratorial,

passando por processos em escala piloto, com o objetivo final de viabilizar a produção em escala industrial (MUKHERJEE et al, 2006).

Os biossurfactantes produzidos por cepas de *Bacillus subtilis* possuem as mesmas propriedades dos demais biossurfactantes. Toma-se como exemplo o biossurfactante de tal microrganismo mais encontrado e mais estudado nos últimos anos, a surfactina.

Descoberta na final da década de 60, a surfactina é uma molécula que possui uma porção hidrofílica, ou uma cabeça polar, formada pelos aminoácidos leucina, valina, ácido aspártico e glutamina, e uma porção hidrofóbica, ou uma cauda apolar, formada por uma cadeia hidrocarbonada de 12 a 15 carbonos (ARIMA et al, 1968). A molécula de surfactina também possui uma característica importante, que é o fato de possuir isômeros que variam tanto na distribuição dos aminoácidos na porção polar, como no comprimento da cauda apolar (PEYPOUX et al, 1999). O peso molecular da surfactina também foi determinado, por espectrometria de massas, e seu valor é de 1037 Daltons (MULLIGAN & GIBBS, 1990).

Como os demais surfactantes, a surfactina possui a propriedade de reduzir a tensão superficial em meios líquidos. No caso da água, a tensão superficial, que normalmente chega a valores de 72 mN/m, em presença de surfactina, atinge valores de até 25 mN/m, o que significa uma alta capacidade de formação de emulsões estáveis de óleo em água (ARIMA et al, 1968; NITSCHKE, 2004; COSTA, 2005; BARROS, 2007). A capacidade da surfactina de formar micelas, como para todos os biossurfactantes, depende da sua concentração no meio. Uma micela de surfactina chega a conter de 50 a 100 moléculas. Um limite entre a

formação e a não-formação de micelas pode ser expresso em termos de Concentração Micelar Crítica (CMC). A CMC da surfactina, determinada em trabalhos anteriores, é de aproximadamente 13 mg/L (SEN & SWAMINATHAN, 2005).

A literatura reporta muitos processos de recuperação, concentração e purificação de biossurfactantes de *Bacillus subtilis*. Entre os mais utilizados estão os processos de precipitação ácida e extração com solventes orgânicos (DESAI & BANAT, 1997), ultrafiltração (MULLIGAN & GIBBS, 1990; LIN et al, 1997; LIN et al, 1998 a; SEN & SWAMINATHAN, 2005), adsorção em carvão ativado (DUBEY et al, 2005) e cromatografias, por coluna aberta (NITSCHKE, 2004) e líquida de alta eficiência (LIN et al, 1997; LIN et al, 1998 a). Todos os processos acima sempre foram aplicados associados uns aos outros, como é o caso da precipitação ácida seguida de extração com solvente orgânico, e da ultrafiltração atuando em conjunto com a cromatografia líquida de alta eficiência (LIN et al, 1998 b).

Porém para tais processos o rendimento ainda é muito pequeno. O grau de pureza da surfactina encontrada nos trabalhos também ainda não atingiu resultados satisfatórios. Em processo de precipitação ácida seguida por extração por solvente orgânico, o grau de pureza não passa de 32% enquanto que em processos de ultrafiltração, o grau de pureza chega a 50% (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Nesses casos, são necessários processos mais rigorosos de purificação, como cromatografia, o que encarece muito o custo final do produto.

Ultrafiltração e microfiltração são processos de separação por membranas muito estudados ao longo dos anos. Ambos possuem a característica de realizar

filtração com escoamento tangencial à membrana (LADISCH, 2001). Em biotecnologia, o processo de microfiltração dedica-se à esterilização dos bioprodutos oriundos do meio de fermentação, pois seus poros são capazes de reter partículas do tamanho de células e organismos unicelulares, como bactérias (DARNON et al, 2003; CHARCOSSET, 2006).

A ultrafiltração dedica-se à retenção de biomoléculas de pesos moleculares que variam de 100 a 100000 Daltons (ALBERTSON, 1977). Com o desenvolvimento da tecnologia de produção de membranas, atualmente as mesmas tornaram-se extremamente seletivas, portanto, com a capacidade de recuperar, concentrar, e de parcialmente purificar bioprodutos desejáveis (CHARCOSSET, 2006; MUKHERJEE et al, 2006).

Diafiltração é a técnica que usa membranas de ultrafiltração para remover, substituir ou diminuir a concentração de sais ou solventes, contendo proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, e outras biomoléculas. O processo seleciona as moléculas que possuem peso menor que o peso molecular limite da membrana e tais moléculas passam pela membrana na sua totalidade (DILEO et al, 1988).

O objetivo da diafiltração é diluir a solução contendo as biomoléculas para aumentar a seletividade da membrana, melhorando, portanto, o grau de pureza ao final do processo, e facilitar a remoção de sais (BEATON & KLINKOWSKI, 1983; DILEO et al, 1988).

Outras técnicas de remoção de sais e soluções tampão, como diálise por exemplo são eficientes, porém possuem limitações. O processo de diálise pode levar dias, requer volumes grandes de água para estabelecimento do equilíbrio, sem contar os riscos de perda de produto com a manipulação manual dos sacos

de diálise e o risco de contaminação. Na diafiltração, o tempo é muito menor, a retenção de produtos de interesse, e conseqüentemente, a remoção dos sais indesejáveis, torna-se maior, e o risco de perda do produto e de contaminação é menor, pois o processo ocorre num único sistema (BEATON & KLINKOWSKI, 1983; LIPNIZKI et al, 2002; DALWADI et al, 2005).

Em diafiltração, os processos são divididos, em princípio, em dois métodos: a diafiltração contínua e a diafiltração descontínua. O resultado final em ambos é o mesmo, porém o fator que determinará o método mais indicado é o volume a ser utilizado no processo (MADSEN, 2001; LIPNIZKI et al, 2002).

Na diafiltração contínua, também conhecida como diafiltração a volume constante, o retido é lavado com uma solução de água, ou solução tampão, a uma vazão de entrada igual à vazão de saída de permeado da solução. Portanto, a concentração de retido não varia, ocorrendo somente a retirada dos sais permeáveis a cada ciclo do sistema. O ciclo do sistema é estabelecido como o volume de permeado retirado do sistema equivalente ao volume inicial do sistema (BEATON & KLINKOWSKI, 1983; MADSEN, 2001; LIPNIZKI et al, 2002). Outra opção considerada recentemente é a diafiltração com volume variável, que propõe uma grande economia de água durante o processo (FOLEY, 2006).

A diafiltração descontínua por sua vez já varia a concentração de retido, de duas diferentes maneiras: por diluição seqüencial, ou por redução de volume. Na diluição seqüencial, a solução com volume especificado é alimentada com água ou solução tampão até determinado volume, e depois deste procedimento, concentrado por ultrafiltração até o volume original (LIN et al, 1989; DUARTE et al, 2001; HOUTCHENS et al, 2006). Na redução de volume, o contrário ocorre,

primeiramente a solução é concentrada por ultrafiltração até determinado volume, e depois adiciona-se água ou solução tampão até que se estabeleça novamente o volume inicial (NG et al, 1976; BEATON & KLINKOWSKI, 1983).

A cada ciclo de diafiltração descontínua, a solução fica cada vez mais concentrada e purificada ao mesmo tempo, com a saída dos sais permeados.

Fatores devem ser levados em conta no momento de escolher qual o melhor método a ser utilizado em diafiltração. Estes fatores são: volume inicial de amostra, concentração e viscosidade, concentração final requerida para a solução, estabilidade da amostra a várias concentrações, volume de tampão requerido para diafiltração, tempo de processamento, tamanho de reservatório disponível, além de fatores econômicos (BEATON & KLINKOWSKI, 1983).

Em biotecnologia, o uso de diafiltração em processos de concentração e purificação de moléculas produzidas por microrganismos tem ganhado muitos estudos nos últimos anos. O processo é importante no sentido de poder separar bioprodutos de interesse, de biomoléculas que geralmente são extraídas em conjunto em outros processos de separação (VAN REIS et al, 1999; STONER et al, 2004; DALWADI, 2005).

Entre os estudos mais desenvolvidos nessa área estão: o isolamento de β -lactoglobulina de caseína (CAESSENS et al, 1997; TOLKACH & KULOZIK, 2005; CHATTERTON et al, 2006), a separação e purificação de benzilpenicilina produzida por fermentação (LI et al, 2004), bem como na extração de antibióticos em geral (TESSIER et al, 2005), e ainda a concentração e purificação de biossurfactantes também produzidos por fermentação (BRYANT, 1990).

Para Bryant (1990), o processo é um tanto vantajoso, de maneira que remove as proteínas co-isoladas, ou seja, elimina compostos anteriormente presentes mesmo após processos de precipitação com sais, ou extração com solventes orgânicos. Além disso, os glicolípídeos isolados pela metodologia descrita pelo trabalho não perderam sua capacidade biossurfactante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção de espuma

A espuma que contém o biossurfactante foi produzida em fermentador piloto marca Pilot New Brunswick 8000 MP 80 (New Brunswick Scientific, USA), de capacidade 80 litros, localizado no CPQBA (Centro Pluridisciplinar de pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas) da Universidade Estadual de Campinas. O inóculo continha cepas de *Bacillus subtilis* Lb5a (Laboratório de Bioaromas - Unicamp, Brasil). Alçadas foram transferidas para um erlenmeyer de 250 ml contendo 150 ml de caldo nutriente, sendo então incubada a 30°C por 12h em banho com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi homogeneizada, 5 ml foram transferidos para cada um dos 24 erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de caldo nutriente e incubadas a 30°C em banho com agitação de 150 rpm por 8 horas.

O inóculo foi padronizado através da verificação da densidade ótica ($\lambda = 610\text{nm}$) da mistura de 10 alíquotas de mesmo volume retiradas diferentes

erlenmeyers tomados aleatoriamente. A partir do resultado de absorbância, e considerando uma curva padrão de concentração celular x densidade ótica, foram tomados um número de frascos com 100ml da cultura de forma que houvesse quantidade de células suficiente para igual densidade celular em todas as bateladas (2×10^7 UFC/ml). O substrato utilizado foi a manipueira, devidamente tratada segundo as condições relatadas por Barros (2007), ou seja, fervura da manipueira a temperatura de 100°C, e centrifugação da mesma em centrífuga contínua. À manipueira, foi adicionada água destilada na proporção de 9 partes de manipueira para 1 parte de água destilada, totalizando um volume de 40 litros de substrato.

O fermentador trabalhou sob agitação constante de 150 rpm e aeração de 15 L/h. A fermentação durou 60 horas, e, à medida que a aeração do sistema produzia a espuma, a mesma era coletada por um sistema acoplado ao fermentador de mangueira e frascos de erlenmeyer, também segundo metodologia de Barros (2007). A espuma, após ser coletada, entra em colapso, e acaba gerando um líquido que contém uma alta concentração de biossurfactante, bem como outros metabólitos secundários, gerados pelo metabolismo da bactéria *Bacillus subtilis*, além de restos celulares do próprio microrganismo. A espuma contém uma alta concentração de biossurfactantes, em relação ao mosto fermentativo, sendo misturada em um único recipiente, possibilitando a análise da mesma em um único lote.

2.2. Pré-tratamento da espuma

A espuma produzida por fermentação foi previamente preparada para passar pelo processo de ultrafiltração. Foi realizada centrifugação em equipamento da marca Beckman (Modelo J 21, Beckman, USA), a uma velocidade de 10000 rpm, por um período de 10 minutos. A centrifugação é utilizada para eliminação dos restos celulares presentes na espuma (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Após centrifugação a espuma é armazenada em temperatura de congelamento, a fim de garantir que não ocorra crescimento celular.

2.3. Processo de diafiltração

O processo foi conduzido com um volume total de 2L de espuma, armazenada em béquer comum. O equipamento utilizado é um módulo de ultrafiltração Pellicon 2 (Millipore, USA), com membranas empacotadas de 0,5 m² de área filtrante, e peso molecular limite de membrana (MWCO ou Molecular Weight Cut-Off) de 30 KDa. O módulo também vem acompanhado de uma bomba peristáltica, com capacidade de vazão de até 10 L/min. Os seguintes parâmetros foram controlados constantemente durante o processo: temperatura à 25 °C, pressão de alimentação a 25 psi, pressão de saída de retido a 15 psi (o que gerou uma pressão transmembrana de 20 psi).

O módulo possui 3 mangueiras de borracha, correspondentes a alimentação, saída de permeado e saída de retido, respectivamente. A alimentação foi, portanto, conectada ao béquer contendo a espuma, bem como a

saída de retido. A saída de permeado foi conectada a uma proveta graduada a fim de medir a vazão de permeado, bem como o volume de permeado retirado do sistema.

Seguindo a metodologia de diafiltração por diluição sequencial, aos 2L de espuma foram adicionados 2L de água destilada, totalizando um volume de 4L de espuma com 50% de sua concentração inicial. Inicialmente, o sistema foi ligado com reciclo total, ou seja, toda a espuma circulava através das membranas, e posteriormente, os parâmetros foram ajustados a fim de condicionar o sistema a funcionar dentro do especificado. O sistema funcionou baseado no intervalo especificado pelo número de ciclos.

Dando início ao processo, a saída de permeado foi conectada à proveta, e o cronômetro foi acionado a fim de se controlar o intervalo de tempo de cada ciclo, bem como a vazão de saída de permeado. Um ciclo corresponde à retirada de 2L de permeado do sistema, e assim que isso ocorre, 2L de água destilada são devolvidos ao sistema. A cada mudança de ciclo, uma amostra de 10mL retido era retirada para análises posteriores. O processo teve um total de 10 ciclos, utilizando, portanto, 20 L de água destilada no total. Ao final, 2L de permeado foram retirados e o sistema foi desfeito.

2.4. Análises das soluções após o processo de diafiltração

As amostras de permeado e de retido, retiradas nos intervalos de tempo especificados no item anterior, passaram por uma análise de tensão superficial, seguindo o método da placa, em tensiômetro modelo K-12 (Krüss, Alemanha),

sendo que as amostras de retido ainda passaram por diluições de 10 e 100 vezes, a fim de se medir a tensão superficial nessas concentrações. O objetivo foi a determinação, através desse método, da Concentração Micelar Diluída (CMD).

As amostras de permeado ainda sofreram análise de cinzas. Num volume de 10 mL coletado, as amostras foram levadas à secagem em estufa, e posteriormente ao aquecimento ao rubro em mufla, ou seja, até que fosse atingida a temperatura de 550 °C, assim permanecendo durante 14 horas.

As amostras de retido passaram posteriormente por análises de sólidos totais pelo método da gravimetria. As amostras, de volume estabelecido de 5 mL, foram inseridas em cadinhos de porcelana, devidamente secos e pesados em balança analítica da marca Explorer (Ohaus Corporation, USA). Posteriormente foram colocadas em estufa de secagem modelo Orion[®] (Fanem, Brasil) a uma temperatura de 50 °C, até que o peso das amostras secas fosse constante.

Dando seguimento ao processo, as amostras foram retiradas da estufa e foram armazenadas em dessecador até que a temperatura das mesmas fosse igual à temperatura ambiente. Assim, as amostras foram extraídas com solvente contendo Clorofórmio e Metanol, na proporção 65:15 (v/v) respectivamente. Com a extração e posterior filtragem em filtros de papel, as amostras semipurificadas foram pesadas em balança analítica, a fim de se determinar seu grau de semipurificação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento mostra que o processo apresentou alta eficiência na remoção de impurezas permeadas pela membrana, e, portanto, das moléculas abaixo do peso molecular limite da membrana, de 30 kDa. Os resultados foram gerados em função dos parâmetros fixados no capítulo anterior, com exceção do tempo de processo, que aqui foi substituído por número de ciclos de adição de solvente, neste caso, a água destilada. Num total de 10 ciclos, a vazão de permeado manteve-se estável, como indicado na Figura 07.

Isso mostra que a saída de moléculas permeadas pelo sistema foi constante ao longo de todo o processo, mostrando a capacidade do equipamento de concentrar e purificar um sistema com uma alta versatilidade e eficiência.

As determinações seguintes referem-se às análises de tensão superficial das amostras de permeado e de retido, análise de sólidos totais, purificação do biossurfactante por extração com solvente orgânico e cálculo da concentração indireta de surfactina em relação a Surfactina da marca Sigma®, com 98% de pureza, baseada na curva de calibração padrão da Figura 02, do capítulo anterior.

Todas essas determinações foram feitas no intuito de determinar o grau final de pureza da solução de biossurfactante depois de 10 ciclos de diafiltração por diluição seqüencial. Os resultados para tensão superficial nas amostras de permeado e nas amostras de retido (puras e em Concentração Micelar Diluída 10 vezes e 100 vezes), são mostrados na Figura 08.

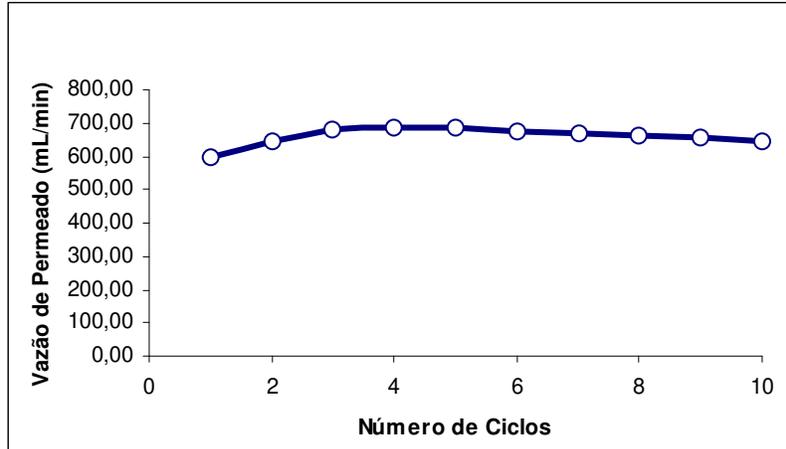


Figura 07 – Variação das concentrações de Sólidos Totais e de Surfactina durante o processo.

As análises de tensão superficial das amostras de permeado e de retido mostram que o processo transcorreu como o esperado. A tensão superficial das amostras de permeado segue uma tendência de queda, e esse fato deve-se provavelmente à perda de biosurfactante durante o processo.

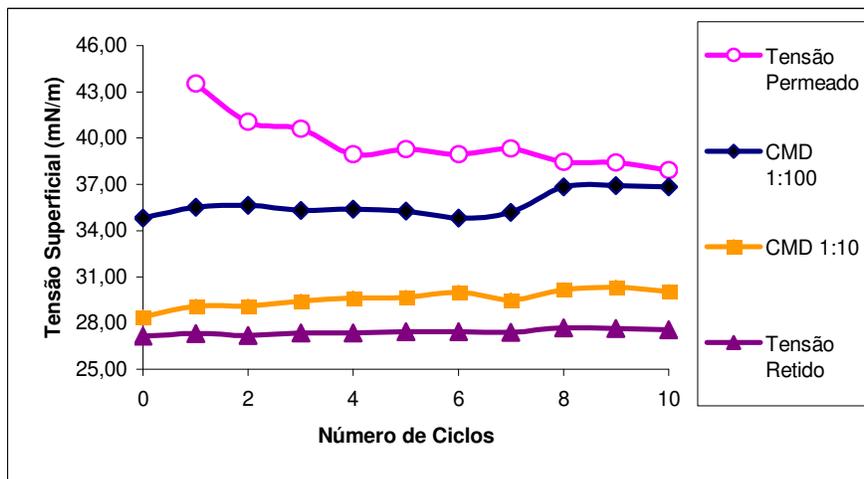


Figura 08 – Análises de Tensão Superficial nas amostras de permeado e de retido em função do número de ciclos do processo de diafiltração.

Os biossurfactantes encontram-se, nesse caso, na forma não micelar, ou seja, as moléculas se locomovem livremente e individualmente dentro da solução, e assim, por possuírem peso molecular menor que o limite estabelecido pela membrana, são permeadas pela mesma, sendo perdidas durante o processo. Porém a perda não é significativa até o sétimo ciclo, quando o comportamento da tensão superficial das amostras de retido começa a se modificar.

Na Figura 08 estão as análises de tensão superficial das amostras de retido, puras, e em CMD de 10 vezes e 100 vezes. Como as amostras de retido de concentrações pura e CMD de 10 vezes ainda estão acima da CMC, os valores de tensão superficial dessas amostras são ainda muito estáveis, dificultando uma análise mais detalhada. No entanto, as amostras de retido, na CMD de 100 vezes o valor inicial, encontram-se abaixo da CMC, e indicam que, a partir do sétimo ciclo, a tensão superficial, que até então era regularmente estável, sofre um aumento, indicando, portanto, que pode haver perda de biossurfactante da porção de retido para a porção de permeado.

O indício de perda de biossurfactante pode ser comprovado através de análises de sólidos totais e de biossurfactante semi purificado por extração por solvente orgânico. A Tabela 02 mostra os resultados das concentrações de sólidos totais, de biossurfactante semi purificado e ainda da concentração indireta de surfactina, em relação a surfactina de 98% de pureza de acordo com a curva padrão da Figura 02, do capítulo anterior. Os dados mostram que os valores de biossurfactante purificado por extração por solvente orgânico, e os valores de Surfactina, obidos através da curva de calibração padrão, seguem a mesma

tendência, ou seja, possuem comportamentos semelhantes, demonstrando a confiabilidade dos dados.

Tabela 02 – Valores das Concentrações de Sólidos Totais, Biossurfactante semi-purificado, Surfactina 98%[®], e Relações do Biossurfactante semi-purificado e Surfactina 98%[®] com a concentração de sólidos totais.

Número de Ciclos	Concentração de Sólidos Totais (g/L)	Concentração de Biossurfactante Semi purificado (g/L)	Concentração de Surfactina 98% (g/L)	Relação Biossurfactante Semi purificado/Sólidos Totais (%)	Relação Surfactina 98%/Sólidos Totais (%)
0	16,24	1,41	0,63	8,66	3,89
1	7,25	1,30	0,58	17,92	7,94
2	5,09	1,27	0,64	24,90	12,51
3	2,89	0,99	0,59	34,10	20,40
4	1,99	0,92	0,58	46,15	29,35
5	1,75	0,89	0,57	50,57	32,64
6	1,55	0,94	0,60	60,78	39,08
7	1,39	0,91	0,60	65,55	42,71
8	1,49	0,79	0,50	52,91	33,91
9	1,25	0,69	0,51	55,61	40,86
10	1,24	0,63	0,52	51,08	42,11

A Figura 09 mostra a íntima relação que existe entre as concentrações de sólidos totais e a de biossurfactante semi purificado e ainda os resultados de purificação do biossurfactante presente em solução baseados nos dados da Tabela 02, além da concentração de cinzas presentes nas amostras de permeado.

O gráfico mostra que, à medida que se acrescenta um novo volume de solvente no processo, ou seja, a partir do início de um novo ciclo, a concentração de sólidos totais decresce, rapidamente no início, e posteriormente, numa taxa menor ao final do processo, enquanto que a concentração de biossurfactante, apesar de apresentar redução, decresce a uma taxa relativamente baixa,

mostrando que há perda de produto durante o processo, principalmente a partir do sétimo ciclo.

Como a própria teoria da diafiltração prega, à medida que se acrescenta um novo volume de solvente ou solução tampão, este tem a função de interagir e retirar os sais da solução alvo do processo. Os sais são responsáveis não só pela quantidade presente, como também por interações paralelas, com peptídeos menores e cadeias carbônicas livres, que são constituintes das impurezas presentes na solução. O fato de não haver interação entre as impurezas e os sais, e sua retirada do sistema, quase que total a partir do sétimo ciclo, faz com que as moléculas de biossurfactantes, na forma de micelas, iniciem um processo de desequilíbrio termodinâmico em termos de constituição de micelas. Esse desequilíbrio faz com que as micelas de biossurfactante comecem a se desfazer, causando, portanto, a perda de biossurfactante no processo.

A Figura 10 ilustra a perda de tais sais para a porção de permeado, e como provavelmente moléculas que dão cor às amostras são de peso molecular menor que o peso limite da membrana, portanto sendo permeado durante cada ciclo.

As interações entre os sais e as moléculas não chegam a interferir tanto no início do processo, visto que a queda na concentração de biossurfactante não passa da casa dos 30 % até o sétimo ciclo. Porém, depois que praticamente a totalidade dos sais foi retirada do sistema a partir do mesmo ciclo, a perda chega, ao final do décimo ciclo, a um valor 50 % do valor inicial.

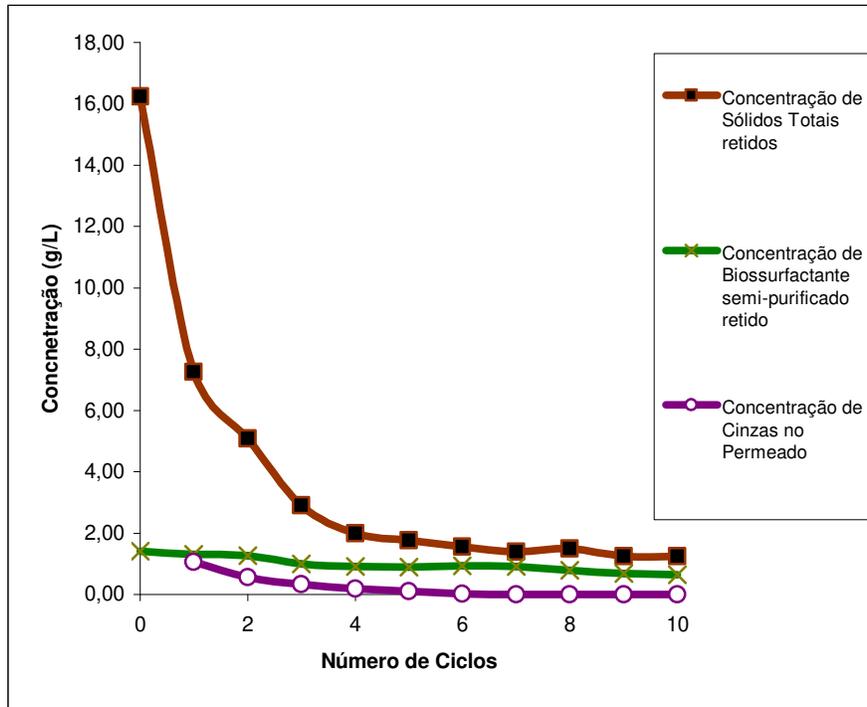


Figura 09 – Comportamento das concentrações de Sólidos Totais retidos, de Biossurfactante semipurificado retido, e de Cinzas no permeado, durante os ciclos do processo de Diafiltração.



Figura 10 – Imagem das amostras de retido em cada ciclo do processo de diafiltração.

A Figura 11 mostra os rendimentos obtidos em termos de graus de pureza, para os valores de biossurfactante semi-purificado por extração com solvente orgânico, e a concentração de surfactina baseada na curva de calibração. Os valores são referentes ao cálculo de pureza das concentrações da Tabela 02.

As interações entre os sais e as moléculas não chegam a interferir tanto no início do processo, visto que a queda na concentração de biossurfactante não passa da casa dos 30 % até o sétimo ciclo. Porém, depois que praticamente a totalidade dos sais foi retirada do sistema a partir do mesmo ciclo, a perda chega, ao final do décimo ciclo, a um valor 50 % do valor inicial.

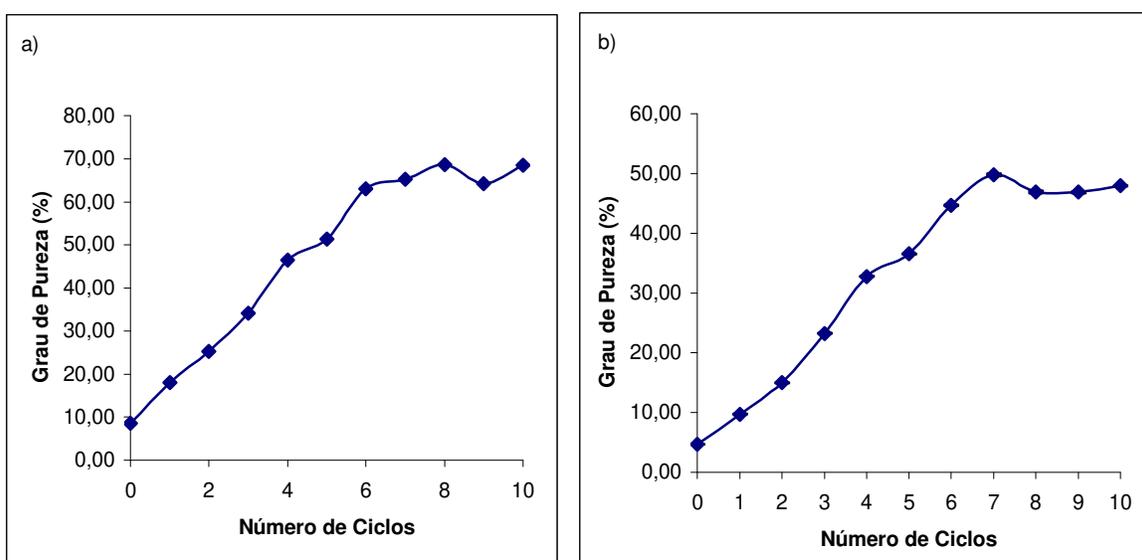


Figura 11 – Grau de Pureza das Amostras durante o processo de Diafiltração, a)em relação ao Biossurfactante Semipurificado e b)em relação à Surfactina 98%®.

4. CONCLUSÃO

O processo de diafiltração é uma alternativa economicamente viável e simples de se purificar soluções de biossurfactante oriundas de processos fermentativos. Os resultados apresentados apontam o processo como uma solução para melhorar as condições de pureza de um produto, facilitando até etapas posteriores de concentração e purificação de alto valor.

No caso da etapa de concentração, a diafiltração pode ser empregada como uma etapa de pré-purificação, antes mesmo de concentrar o produto desejado. Assim, o processo de concentração por ultrafiltração pode se tornar muito mais eficiente, concentrando biossurfactantes já num elevado grau de pureza. O processo pode ser otimizado, na medida em que, a partir do sétimo ciclo, não há mais rendimento suficiente, o que indica que o processo pode ser encerrado a partir deste ciclo.

Como o grau de pureza atingido é relativamente alto, pode-se até, dependendo das exigências de mercado, considerar o produto de diafiltração como final, havendo somente a necessidade, no caso, de uma etapa posterior de secagem e embalagem do produto.

Esse alto grau de pureza atingido também ajuda em processos posteriores de purificação na medida que não prejudica os equipamentos cromatográficos, por exemplo, por possuir um baixo número de impurezas. Assim, o rendimento final do processo torna-se muito melhor. Outro ponto em destaque é a utilização de água como solução purificadora do processo de diafiltração, recurso abundante e de custo muito baixo. Vale ressaltar ainda a necessidade de otimização de tal

processo para sua utilização em escala industrial no futuro, com a preocupação principalmente da economia e reutilização de água.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSON, P. A. **Ultrafiltration Handbook**. Technomic Publishing, Lancaster, USA, 1977.

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.

BARROS, F. F. C. **Estudo das Variáveis de Processo e Ampliação de Escala na Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* em Manipueira**. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007, 102 p.

BEATON, N. C.; KLINKOWSKI, P. R. Industrial Ultrafiltration Design and Application of Difailtration Process. **Journal of Separation Process Technology**, 4 (2): 1-10, 1983.

BRYANT, F. O. Improved Method for the Isolation of Biosurfactant Glycolipids from *Rhodococcus* sp. Strain H13A. **Applied and Environmental Microbiology**, 56 (5): 1494-1496, 1990.

CAESSENS, P.; VISSER, S.; GRUPPEN, H. Method for the isolation of bovine β -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. **International Dairy Journal**, 7 (4): 229-235, 1997.

CHARCOSSET, C. Membrane Process in Biotechnology: an Overview. **Biotechnology Advances**, 24: 482-492, 2006.

CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin – technical implications for processing. **International Dairy Journal**, 16 (11): 1229-1240, 2006.

COSTA, G. A. N. **Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações**. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2005, 87p.

DALWADI, G.; BENSON, H. A. E.; CHEN, Y. Comparison of Diafiltration and Tangential Flow Filtration for Purification of Nanoparticle Suspensions. **Pharmaceutical Research**, 22 (12): 2152-2162, 2005.

DARNON, E.; MORIN, E.; BELLEVILLE, M. P.; RIOS, G. M. Ultrafiltration within Downstream Processing: some Process Design Considerations. **Chemical Engineering and Processing**, 42: 299-309, 2003.

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

DILEO, A.; REYES, G.; WARANCH, L. M. **Diafiltration Method**. UNITED STATES PATENT, number 4728430, 1988.

DUARTE, R. M. B. O.; SANTOS, E. B. H.; DUARTE, A. C. Comparison between diafiltration and concentration operation modes for the determination of permeation coefficients of humic substances through ultrafiltration membranes. **Analytica Chimica Acta**, 442 (1): 155-164, 2001.

DUBEY, K. V.; JUWARKAR, A. A.; SINGH, S. K. Adsorption-Desorption Process Using Wood-Based Activated Carbon for Recovery of Biosurfactant from Fermented Distillery Wastewater. **Biotechnology Progress**, 21: 860-867, 2005.

FOLEY, G. Ultrafiltration with variable volume diafiltration: a novel approach to water saving in diafiltration processes. **Desalination**, 199 (1-3): 220-221, 2006.

HOUTCHENS, R. A.; GAWRYL, M. S.; LIGHT, W. R.; BAQAI, J. **Purification of red blood cells by separation and diafiltration**. UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE GRANTED PATENT, nº US7001715, 2006.

LADISCH, M. R. **Bioseparations Engineering - Principles, Praticce and Economics**. John Wiley & Sons, New York, USA, 2001.

LI, S. Z.; LI, X. Y.; CUI, Z. F.; WANG, D. Z. Application of ultrafiltration to improve the extraction of antibiotics. **Separation and Purification Technology**, 34 (1-3): 115-123, 2004.

LIN, S. S.; CHIANG, B. H.; HWANG, L. S. Recovery of Perilla Anthocyanins from Spent Brine by Diafiltration and Electrodialysis. **Journal of Food Engineering**, 9 (1): 21-33, 1989.

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.

LIN, S. C; CHEN, Y. C.; LIN, Y. M. General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactants analysis and purification. **Journal of Chromatography A**, 825: 149-159, 1998 (a).

LIN, Sung-Chyr; LIN, Kuo-Ging; LO, Chih-Chen; LIN, Yo-Ming. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme and Microbial Technology**. 23: 267-273, 1998 (b).

LIPNIZKI, F.; BOELSMAND, J.; MADSEN, R. F. Concepts of industrial-scale diafiltration systems. **Desalination**, 144: 179-184, 2002.

MADSEN, R. F.; Design of Sanitary and Sterile UF- and Diafiltration Plants. **Separation and Purification Technology**, 22-23: 79-87, 2001.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R.. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. 24 (11): 509-515, 2006.

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

NITSCHKE, M. **Produção e Caracterização de Biossurfactante de *Bacillus subtilis* Utilizando Manipueira como Substrato**. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004, 88p.

NG, P.; LUNDBLAD, J.; MITRA, G. Optimization of Solute Separation by Diafiltration. **Separation Science**, 2: 499 – 502, 1976.

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

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, 40: 2953-2958, 2005.

STONER, M. R.; FISCHER, N.; NIXON, L.; BUCKEL, S.; BENKE, M.; AUSTIN, F.; RANDOLPH, T. W.; KENDRICK, B. S. Protein-solute interactions affect the outcome of ultrafiltration/diafiltration operations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 93 (9): 2332-2342, 2004.

TESSIER, L.; BOUCHARD, P.; RAHNI, M. Separation and purification of benzylpenicilin produced by fermentation using coupled ultrafiltration and nanofiltration technologies. **Journal of Biotechnology**, 116 (1): 79-89, 2005.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinopeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, 67 (1-2): 13-20, 2005.

VAN REIS, R.; BRAKE, J. M.; CHARKOUDIAN, J.; BURNS, D. B.; ZYDNEY, A. L. High-performance tangential flow filtration using charged membranes. **Journal of Membrane Science**, 159 (1-2): 133-142, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de recuperação de biossurfactantes por ultrafiltração leva a produção dessa substância a novos patamares em termos de mercado. Um processo fermentativo com parâmetros otimizados já constituía uma das peças fundamentais. Porém, de igual ou maior importância, é o processo de recuperação, concentração e purificação de biossurfactantes.

O processo de ultrafiltração mostra-se muito versátil, prático e economicamente viável frente a outros processos. Alguns aspectos a serem analisados, por exemplo, são: a compactação do equipamento; a demanda baixa de energia, visto que há somente a necessidade de utilização de bombas para acionar o sistema, ou seja, a pressão pode ser controlada por válvulas do próprio equipamento e a temperatura controlada por trocas térmicas; a não utilização de solventes químicos de alto custo, o que gera dois resultados de grande importância, no aspecto econômico, pois evita altos gastos com tais materiais, e no ponto de vista ambiental, pois evita a geração de resíduos químicos prejudiciais à natureza como um todo.

A versatilidade citada no parágrafo anterior refere-se ao fato do mesmo equipamento ser utilizado em dois processos distintos, e de várias maneiras podendo ser reutilizado várias vezes, mostrando confiabilidade e durabilidade. Num primeiro momento, pelo método da diafiltração pode-se conseguir elevados graus de pureza dos biossurfactantes, e posteriormente, com o mesmo equipamento consegue-se a concentração dos biossurfactantes por ultrafiltração. E atualmente com o alto número de membranas disponíveis em mercado, altos

níveis de concentração e purificação são alcançados, porém ainda com alguns fatores limitantes da própria natureza do processo, e principalmente, dos biossurfactantes presentes.

A preocupação com os problemas ambientais ganha sempre grande destaque quando se inicia um projeto de grande magnitude, e até o momento, sempre foram apresentadas soluções ou medidas preventivas que evitem qualquer dano ao meio ambiente como um todo, pois apesar de apresentar resíduos, estes são de origem biológica e se degradam facilmente no ambiente, sem qualquer prejuízo.

O mercado de biossurfactantes promete alto crescimento no decorrer dos próximos anos. A tecnologia vem ganhando cada vez mais destaque, além da busca de novas soluções em termos de processo, como é o caso deste trabalho. Ainda no campo de pesquisa, outro destaque é a investigação dos biossurfactantes no que diz respeito às suas propriedades funcionais. Para cada propriedade funcional elucidada, e para cada exigência de mercado, graus de pureza serão exigidos como qualidade do produto, fato que credencia os métodos descritos neste trabalho como excelente alternativa na determinação do grau de pureza desejado. Novas descobertas relacionadas à funcionalidade dos biossurfactantes levam a novos nichos de mercado, vislumbrando um campo muito extenso dentro do cenário econômico.