



FERNANDA FRANZONI PESCU MO

**“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTO
ATIVO DE SUPERFÍCIE PRODUZIDO POR *Gordonia
amicalis*”**

**Campinas
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDA FRANZONI PESCUOMO

**“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTO ATIVO
DE SUPERFÍCIE PRODUZIDO POR *Gordonia amicalis*”**

Orientador(a): Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA FERNANDA FRANZONI PESCUOMO
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LUCIA REGINA DURRANT**

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

P437i	<p>Pescumo, Fernanda Franzoni. Isolamento e caracterização de composto ativo de superfície produzido por <i>Gordonia amicalis</i> / Fernanda Franzoni Pescumo -- Campinas, SP : [s.n.], 2013. Orientador: Lúcia Regina Durrant. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.</p> <p>1. Composto ativo de superfície. 2. Emulsificantes. 3. Bactérias. 4. <i>Gordonia amicalis</i>. 5. Biotecnologia - pesquisa. I. Durrant, Lúcia Regina, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Isolation and characterization of a SAC produced by *Gordonia amicalis*

Palavras-chave em inglês:

SAC (Surface active compounds)

Emulsifier

Bacteria

Gordonia amicalis

Biotechnology - Research

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Lucia Regina Durrant [Orientador]

Ranulfo Monte Alegre

Elisangela Franciscan Guimaro Dias

Data da defesa: 28-02-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
(Orientadora – FEA - Unicamp)

Dra. Maricy Raquel Lindebah Bonfá
(Membro – FEQ – Unicamp)

Dra. Elisangela Franciscon Guimaro Dias
(Membro – FT – Unicamp)

Dra. Valéria Maia de Oliveira
(Membro Suplente – CPQBA – Unicamp)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(Membro Suplente – FEA – Unicamp)

Dedico meu trabalho à minha mãe Shirley e

ao meu pai Altair.

A ela por tudo que proporcionou a minha vida.

A ele, que tão pouco esteve presente, mas que sua lembrança ainda vive.

AGRADECIMENTOS

Durante esses anos em que se desenrolou meu mestrado, muitas foram as pessoas e instituições presentes e importantes. Provavelmente seja injusta com algumas pessoas que não serão lembradas, mas sintam-se importantes da mesma forma.

Gostaria de agradecer primeiramente à Universidade Estadual de Campinas, e em especial à Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), por toda a formação proporcionada e pela oportunidade de realização tanto da minha graduação quanto do meu mestrado, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa que possibilitou meus estudos.

À Profa. Lucia Regina Durrant também pela oportunidade, pela orientação, ajuda e cuidados durante a Iniciação Científica e pela confiança para dar prosseguimento no mestrado.

À banca pelos apontamentos e sugestões para a melhoria do trabalho.

À Andreia, pelos ótimos conselhos e contatos na fase final de experimentos, sua ajuda foi importantíssima, tanto para a realização dos experimentos quanto para o meu crescimento profissional.

À minha família que sempre esteve ao meu lado, em momentos bons e ruins, e que sempre acreditaram em mim. Em especial à minha mãe Shirley, minha avó Odila e meu irmão Talles, pessoas que sei que sempre poderei contar. À minha tia Inês, que mesmo a distância sempre esteve preocupada e me ofereceu palavras de conforto. Não

poderei esquecer também dos que não podem ver o fruto desse trabalho, mas que torceram até o fim pelas minhas realizações: meu pai Altair, meu avô Tônico, e minha avó Cida. Vocês também foram parte do que sou hoje, e não poderia deixar de agradecê-los.

Aos amigos do LFSM Ísis, Ivan, Ligia, Emerson, Mathew e Cristina pelos momentos de descontração e pelo crescimento que agregaram. Em especial à Francine, amiga e companheira de tantos experimentos na Iniciação, e que me apresentou os imensos campos de pesquisa que são a microbiologia ambiental e a biotecnologia.

Ao pessoal do Laboratório de Toxinas Microbianas, Prof. Zé Luís, Norma, Rafael e Dona Laura, pelo suporte técnico nos experimentos.

À Profa. Valéria e à Bruna da Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA, pelo auxílio nas análises de tensão superficial.

Ao pessoal do LQS, o Prof. Oswaldo, a Ana e o Paulinho, pelo auxílio na caracterização química da amostra.

Aos meus grandes amigos que, mesmo a distância, estiveram presentes durante todo o processo. Rafaela, Mônica, Juliana Higa, Karina, Fernanda, Danilo, Andrea, Ana, Érika e Gil. Em especial à Aline, que me ajudou em alguns experimentos e esteve presente em todas as fases, além de sugestões dadas ao texto do boneco, e ao Bruno, pelos apontamentos importantes na redação final do texto.

Aos meus companheiros de república: Cinthia e Pedro, pelos momentos compartilhados, e almoços coletivos em épocas mais turbulentas. Ao Vitor, pelas dicas para a formatação das figuras.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 Introdução	1
2 Objetivos	3
2.1 Objetivos gerais	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Compostos Ativos de Superfície	4
3.2 Clasificação dos CASs	6
3.2.1. Classificação por organismo produtor	6
3.2.2. Classificação por localização celular	7
3.2.3. Classificação por Estrutura Química	8
3.3. Vantagens dos surfactantes microbianos	13
3.3.1. Estabilidade a temperatura, pH e salinidade	13
3.3.2. Atividade emulsificante	14
3.3.3. Atividade de superfície e interface	15
3.3.4. Biodegradabilidade	15
3.3.5. Baixa toxicidade	16
3.4. Função biológica	17
3.5. Aplicações biotecnológicas	18
3.6. Fatores que afetam a produção de surfactantes microbianos	20
3.7. Otimização e viabilidade econômica da produção	22
3.8. Métodos de Isolamento de bactérias produtoras de Biosurfactantes	24
3.9. O gênero <i>Gordonia</i>	25
3.10. Isolamento e purificação de biosurfactantes	26
3.11. Caracterização química	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Microrganismo utilizado	30
4.2. Análise da sequência do gene ribossomal 16S da linhagem isolada	30
4.3. Meio de cultivo	31
4.4. Manutenção e pré-inóculo da cultura	32
4.5. <i>Screening</i> inicial para a produção de surfactante microbiano	32
4.6. Cultivo para a produção de biosurfactantes	33
4.6.1. Cinética do crescimento	33
4.6.1.1. Parâmetros avaliados	34
4.6.1.1.1. Densidade óptica	34
4.6.1.1.2. Unidades Formadoras de Colônia	34
4.6.1.1.3. pH	34

4.6.1.1.4. Tensão superficial	35
4.7. Extração e purificação dos biossurfactantes	35
4.8. Caracterização Química do CAS	36
4.8.1. Análise do extrato bruto por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	36
4.8.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformado de Fourier (IR-TF)	37
4.9. Propriedade do CAS	37
4.9.1. Atividade emulsificante	37
4.9.1.1. Estabilidade a temperatura, pH, salinidade e tempo de cultivo	38
4.9.2. Análise de Ângulo de Contato	38
4.9.3. Potencial Zeta	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Análise da sequência do gene ribossomal 16S do isolado	40
5.2. <i>Screening</i> inicial para a produção de surfactante microbiano	41
5.3. Cinética do Crescimento	42
5.3.1. Unidades formadoras de colônia	42
5.3.2. Densidade óptica	44
5.3.3. pH	45
5.3.4. Tensão Superficial	46
5.4. Caracterização química	47
5.4.1 Análise do Extrato Bruto por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	47
5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformação de Fourier (IR-TF)	49
5.5. Propriedades CASs	50
5.5.1. Atividade emulsificante	50
5.5.1.1. Emulsão do tipo A/O	50
5.5.1.2. Emulsão do tipo O/A	53
5.5.1.3. Estabilidade da emulsão a temperatura, pH, salinidade, tempo de cultivo e duração da emulsão	54
5.5.2. Ângulo de Contato	56
5.5.3. Potencial Zeta	60
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. ANEXOS	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Tipos de CASs produzidos por microrganismos.	7
Tabela 4.1. Meio GYP, modificado de Kushida (2000)	30
Tabela 5.3. AE ₂₄ do tipo A/O do extrato bruto livre de células em diferentes substratos.	51
Tabela 5.4. Atividade Emulsificante do tipo O/A do extrato bruto livre de células em diferentes substratos.	52
Tabela 5.5. Ângulo de contato da água e do CAS disperso em água em teflon, lâmina de vidro e no material metálico.	56
Tabela 8.1. Variação do número de UFC, em base logarítmica, de <i>Gordonia amicalis</i> cultivada em meio GYP para a produção do CAS.	75
Tabela 8.2 – Variação da DO ($\lambda = 600\text{nm}$) do meio GYP durante o crescimento de <i>Gordonia amicalis</i> para a produção do CAS	76
Tabela 8.3 – Variação da Tensão superficial do meio GYP durante produção de CAS por <i>Gordonia amicalis</i> .	77
Tabela 8.4- Variação do pH do meio GYP durante a produção do CAS por <i>Gordonia amicalis</i> .	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Classificação dos CASs microbianos de acordo com a localização celular em uma célula procariótica hipotética, onde: 1) intercelular; 2) superfície celular interposta; 3 extracelular	8
Figura 3.2. Estrutura de alguns surfactantes microbianos.	10
Figura 5.1. Árvore filogenética da sequência de RNAr 16S da bactéria <i>Gordonia amicalis</i> isolada (indicada como CPQBA 190-07 DRM) e sequências de outras espécies de <i>Gordonia</i> obtidas de bases de dados. Os números nas árvores são valores de bootstrap. A distância é indicada na escala.	39
Figura 5.2: Variação do número de UFC durante o crescimento de <i>Gordonia amicalis</i> em meio GYP para a produção de CAS.	41
Figura 5.3: Variação da DO ($\lambda = 600\text{nm}$) durante o crescimento da <i>Gordonia amicalis</i> no meio GYP, por tempo de cultivo.	43
Figura 5.4: Variação do pH durante o crescimento da <i>Gordonia amicalis</i> no meio GYP, por tempo de cultivo.	44
Figura 5.5: Variação das Unidades de Redução de Tensão Superficial durante o crescimento de <i>Gordonia amicalis</i> em meio GYP por tempo de cultivo.	45
Figura 5.6. Revelação placa de CCD em: a) luz UV; b) ácido sulfúrico 6N; c) ninidrina 0,02%.	48
Figura 5.7. Espectroscopia IR-TF do CAS produzido por <i>Gordonia amicalis</i> .	49
Figura 5.8- Emulsão do tipo A/O apresentada pelo EBLC após cultivo de 7 dias, tendo tolueno como substrato, onde A contém o EBLC, e B é o controle negativo com o meio de cultura GYP autoclavado	51
Figura 5.9. Emulsão do tipo A/O apresentado pelo EBLC isolado por precipitação com sulfato de amônio após 7 dias em diferentes substratos.	51
Figura 5.10. AE_{24} dos EBLCs extraídos em 7 e 14 dias, após 1 hora em diferentes	54

temperaturas.

Figura 5.11. AE_{24} dos EBLCs extraído em 7 e 14 dias em diferentes salinidades (em % de NaCl).	55
Figura 5.12. AE_{24} dos EBLCs extraídos em 7 e 14 dias, em diferentes pHs.	56
Figura. 5.13. Comportamento da gota de água e de água com o CAS em: 1) material metálico; 2) teflon; 3) vidro.	58
Figura 5.14. Ângulo de contato da água e da água com CAS em material metálico, com medições realizadas a cada 10 segundos.	59
Figura 5.15. Ângulo de contato da água e do CAS disperso em água em superfície de vidro, com medições a cada 10 segundos.	50
Figura 5.16. Ângulo de contato de água e CAS disperso em água em superfície de teflon, com medições a cada 10 segundos.	60
Figura 5.17. Potencial Zeta do CAS.	61

ABREVIações

AE₂₄ Atividade Emulsificante em 24 horas

A/O água em óleo

CAS Composto Ativo em Superfície

CCD Cromatografia de Camada Delgada

Cm centímetro

CTAB Brometo de Cetil Trimetil Amônio

EA₂₄ Emulsification Activity in 24 hours

EBL Extrato Bruto Liofilizado

EBLC Extrato Bruto Livre de Células

FTIV Espectrometria no Infravermelho com Transformadas de Fourier

GYP (*Glucose, yeast extract, Peptone*)

IC₅₀ Concentração Inibitória 50%

IR-TF Espectroscopia de Infravermelho com Transformado de Fourier

MEOR *Microbial Enhanced Oil Recovery*

O/A óleo em água

rpm Rotações Por Minuto

SDS Sodium Dodecyl Sulphate

TLC *Thin Layer Chromatography*

UFC Unidades Formadoras de Colônia

RESUMO

Biossurfactantes e bioemulsificantes são compostos ativos de superfícies (CAS) produzidos por micro-organismos. Desempenham várias funções biológicas, e sua característica anfifílica, juntamente com baixa toxicidade, biodegradabilidade e resistência a extremos de pH, temperatura e salinidade, tem despertado o interesse para a aplicação dessas moléculas em processos biotecnológicos. Porém, o alto custo aliado à baixa produção ainda são impedimentos para a utilização em larga escala. Os desafios para se implementar a produção são: desenvolvimento de estratégias para tornar a produção economicamente viável e o isolamento de moléculas e micro-organismos mais eficientes. Neste trabalho, foi estudada a produção, isolamento, extração e caracterização de um CAS por *Gordonia amicalis*. O micro-organismo foi cultivado em meio GYP (*glucose, extracto de levedura, peptona*) por 7 dias, e a extração foi feita por precipitação com sulfato de amônio, que resultou em uma concentração de 0,5 g/L do extrato bruto em meio líquido. O CAS não reduziu significativamente a tensão superficial do meio GYP, e apresentou um balanço hidrofílico-lipofílico (HBL) de caráter lipofílico, apresentando mais emulsões do tipo água em óleo (A/O) do que óleo em água (O/A). A molécula apresentou estabilidade a temperaturas de 25°C a 100°C, pH de 2 a 10 e salinidades de 5% a 15% quando cultivado por 7 dias, e foi capaz de modificar a interface água/superfície na análise de ângulo de contato. O extrato de 14 dias apresentou Atividade Emulsificante em 24 horas (AE₂₄) reduzida em temperaturas acima de 50°C, e ausente em pH ácido e salinidades de 5% e 10%. Análises de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) revelaram presença de aminoácidos e açúcares na molécula e a análise do potencial zeta revelou que o CAS é um surfactante aniônico. Nas análises de Espectrometria no Infravermelho com Transformadas de Fourier (IR-TF) foram observados estiramentos indicativos de agrupamentos O-H e C-O, que podem indicar presença de grupos éter ou

ésteres. O CAS produzido por *Gordonia amicalis* em meio sintético GYP mostrou-se um eficiente agente emulsificante, com potencial para aplicações biotecnológicas futuras.

ABSTRACT

Biosurfactants and bioemulsifiers are surface active compounds (SACs) produced by microorganisms. They have a wide variety of biological functions. Its amphiphilic characteristic, with low toxicity, biodegradability and resistance to extremes of pH, temperature and salinity, has increased the interest of these molecules for application biotechnological process. However, high costs and low production rates are restrictions to their widespread use. The challenges for implementing production are: developing strategies to turn the production economically feasible and isolating more efficient molecules and microorganisms. In this work, we studied the production, isolation, extraction and characterization of a SAC by a *Gordonia amicalis*. The microorganism was grown in GYP (Glucose, Yeast extract, Peptone) medium for 7 days, and the isolation was carried out by precipitation with ammonium sulfate, which resulted in 0.5 g / L of crude extract. The SAC did not significantly reduce the surface tension of GYP medium, and showed an hydrophilic-lipophilic balance (HLB) with lipophilic character, showing more water in oil (W/O) emulsions than oil in water (O/W) emulsions. The molecule extracted at 7 days was stable at temperatures ranging from 25 to 100 °C, pH of 2-10 and salinities of 5-15%, and can modify the water/surface contact by the angle of contact analysis. The 14-day isolated extract showed EA_{24} reduced at temperatures above 50 °C, and had no Emulsification Activity in 24 hours (EA_{24}) in acid pH and salinity of 5% and 10%. Thin Layer Chromatography (TLC) analysis revealed the presence of sugars and amino acids in the molecule and the zeta potential analysis revealed the compound is an anionic surfactant. In the Fourier Transformed Infrared Spectrometry (FTIV) it were observed stretches indicatives of O-H and C-O groups, that might indicate ether or ester groups. The SAC produced by *Gordonia amicalis* in GYP medium proved to be an efficient emulsifier, with potential for biotechnological applications.

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfifílicas, capazes de interferir e modificar superfícies tanto entre líquidos como entre líquidos e sólidos. Por essa característica, podem ser denominados Compostos Ativos de Superfície (CAS). Seus usos vão desde utilidade doméstica, em produtos detergentes e saponáceos, até processos industriais e de sanitização de laboratórios e equipamentos médicos.

Uma fração considerável dos surfactantes comercializados atualmente é produzida a partir de derivados do petróleo. A preocupação com produtos ecologicamente viáveis e com a substituição do petróleo nos processos produtivos despertou o interesse em estudos para a substituição dessa matéria-prima nos setores produtivos. Além de derivados do petróleo, também há surfactantes comercializados produzidos a partir de óleos vegetais. Apesar de menos poluentes, ainda assim há o problema da necessidade de desmatamento de áreas florestais para plantações.

Uma alternativa que tem sido apontada é a produção de surfactantes por microrganismos. Além de apresentar menor toxicidade e maior biodegradabilidade em ecossistemas naturais, essas moléculas apresentam características e propriedades semelhantes aos surfactantes químicos. As únicas desvantagens para sua comercialização são a baixa produção e os custos, superiores em relação aos surfactantes já utilizados. Alguns CASs microbianos já são comercializados para fins cosméticos e de biorremediação, mas para que seu uso seja amplificado, são necessários estudos que abordem tanto otimização da produção para redução de custos, quanto isolamento de novas linhagens reprodutoras e de novas moléculas, que possuam características desejáveis a processos biotecnológicos.

Esse estudo teve por objetivo investigar a produção de CAS por *Gordonia amicalis* em meio rico em açúcares, e compreender a estrutura da molécula produzida

através de seu isolamento, purificação e identificação, assim como suas propriedades para posteriores aplicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O principal objetivo desse trabalho foi estudar a produção de um Composto Ativo de Superfície por *Gordonia amicalis* e caracterizá-lo, procurando fornecer subsídios para estudos futuros da aplicação do microrganismo ou da molécula em processos biotecnológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar, através de métodos moleculares, a linhagem anteriormente descrita como *Planococcus citreus*;
- Estudar a cinética de produção de um possível CAS pela linhagem bacteriana;
- Isolar e purificar o CAS produzido através de método de extração com Sulfato de Amônio e de Purificação por TLC;
- Caracterizar quimicamente o CAS através de Métodos colorimétricos de CCD e de FTIV;
- Analisar as propriedades emulsificantes e estabilidade a condições extremas da molécula isolada;
- Analisar as interações do CAS com superfícies através de análises de ângulo de contato e de potencial Zeta.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Compostos Ativos de Superfície (CAS)

Surfactantes são moléculas anfifílicas, capazes de reduzir a tensão superficial ar/água e a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, podendo formar emulsões do tipo óleo/água (O/A) e água/ óleo (A/O). Também possuem a propriedade de formar micelas quando em alta concentração. Por causa dessas propriedades de interferir e modificar superfícies, são denominados compostos ativos de superfície (CASs), podendo ser utilizados em vários setores industriais, como na produção de fármacos, cosméticos, alimentos, na agricultura, em processos de remediação de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados, recuperação de óleos, na medicina, entre outros (DESAI, BANAT, 1997; FARIA, 2010; KOSARIC, 1992; SINGH *et al*, 2007; SINGH, 2012).

Por suas características químicas e, por consequência, suas amplas aplicações na indústria, o mercado de surfactantes tem crescido. Dados do ano 2000 mostram que a produção mundial de surfactantes foi de 17 milhões de toneladas métricas, com taxas de crescimento futuras de 3-4% ao ano no mundo, e 1-2% na União Europeia (PATTANATHU *et al*, 2008). Nos Estados Unidos, a produção de biossurfactantes em 2008 foi estimada em 3,5 milhões de toneladas, a maior parte utilizada para a produção de detergentes de uso domiciliar. Dessa quantia, 40% são produzidos a partir de derivados de petróleo e 60% à partir de óleos (RUST, WILDES, 2008).

Embora o mercado de surfactantes esteja em crescimento eles representam riscos ambientais, como poluição de corpos d'água, e à saúde, como reações alérgicas em produtos cosméticos. Alguns problemas dos surfactantes sintéticos, como alta

toxicidade, baixa biodegradabilidade, alta emissão de CO₂ no processo produtivo, são argumentos favoráveis à produção de surfactantes ambientalmente menos agressivos.

Uma alternativa ao uso seria a utilização de surfactantes produzidos por micro-organismos. Entre as vantagens dos surfactantes microbianos, podemos citar: baixa toxicidade, alta eficiência, biodegradabilidade, especificidade, atividade antimicrobiana (KLOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, 2011; OKOLIEGBE, AGARRY, 2012). Como desvantagens, a produção ainda é custosa, e os processos para produção em larga escala ainda não estão bem desenvolvidos. Tornam-se necessários estudos para redução de custos e para isolamento e caracterização de novas moléculas.

Em micro-organismos, esses compostos possuem duas porções: uma hidrofóbica, normalmente constituída de ácidos graxos saturados, insaturados e/ou hidroxilados, ou alcoóis graxos; e uma hidrofílica, que consiste de mono-, di- ou oligossacarídeos, peptídeos ou proteínas (LANG, 2002). Esses CASs microbianos podem ser de dois tipos: biossurfactantes (aqueles que reduzem a tensão superficial na interface ar-água) ou bioemulsificantes (aqueles que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, ou na interface sólido-líquido), sendo que os biossurfactantes usualmente exibem capacidade emulsificante. Por outro lado, os bioemulsificantes não diminuem necessariamente a tensão superficial (OKOLIEGBE, AGARRY, 2012). Entretanto, Neu (1996) divide os CASs microbianos em 3 tipos, baseado no peso molecular e na polaridade da molécula: biossurfactantes, polímeros anfifílicos e polímeros polifílicos. De acordo com esse estudo, os biossurfactantes seriam os de baixo peso molecular, compreendendo os glicolipídeos e os polipeptídeos, capazes de diminuir a tensão superficial a 28-30 mN/m. Já os poliméricos seriam os de alta massa molecular, podendo-se diferenciá-los pela hidrofobicidade. O primeiro subgrupo apresenta uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica (compreendem os lipopolissacarídeos, os ácidos lipoteoicos e os lipoglicanos), enquanto o segundo apresenta grupos hidrofóbicos por toda a sua extensão, compreendendo os polissacarídeos hidrofóbicos e o emulsan.

3.2 Classificação dos CASs microbianos

Os CASs microbianos podem ser classificados de três formas:

- de acordo com o micro-organismo que o produz: pode ser produzido por bactérias, fungos e arqueias (MAIER, 2003);
- de acordo com a localização celular: pode ser excretado, presente na membrana celular ou na parede celular (ALEXANDER, 1999);
- características químicas: pode ser dividido em glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídios, lipídios neutros e ácidos graxos, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (LANG, 2002).

3.2.1 Classificação por organismo produtor

No primeiro grupo, podem ser divididas em moléculas produzidas por fungos filamentosos, leveduras, bactérias e arqueias. Uma mesma espécie pode produzir mais de um tipo de CAS. Na tabela 3.1 estão expostos alguns CASs produzidos por micro-organismos diversos.

Como apontado na tabela, alguns biossurfactantes e bioemulsificantes são mais comumente encontrados em determinados grupos de organismos (não sendo, porém exclusivos dos mesmos), como os soforolipídeos em alguns fungos e ramnolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa* (SOBERÓN-CHAVEZ *et al*, 2005). Entretanto, algumas classes de organismos, como as arqueias, foram pouco exploradas, e sua composição e habitat únicos podem ser indícios de moléculas surfactantes com diferentes propriedades das habitualmente estudadas (KEBBOUCHE-GANA *et al*, 2009).

Tabela 3.1. Tipos de CASs produzidos por microrganismos

Micro-organismo produtor	Tipo de CSA e nome (caso tenha)	Referência
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Exopolissacarídeo	FREITAS <i>et al</i> , 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídeos	JARVIS <i>et al</i> , 1949
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	Glicoproteína AP-6	PERSSON <i>et al</i> , 1988
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealose dimicolatos	RAPP <i>et al</i> , 1979
<i>Candida (torulopsis)</i> <i>bombicola</i>	Soforolipídio	KOSARIC 1992; WILLIAMS, 2009.
<i>Candida antártica</i>	Soforolipídeo	DAVEREY <i>et al</i> , 2011.
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina	ARIMA <i>et al</i> , 1968
<i>Acinetobacter</i> sp. H01-N	Fosfolipídeos, e ácidos graxos, mono e diglicerídeos	KÄPELLI & FINNERTY, 1979
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Complexo proteína-polissacarídeo	MATSUURA, 2004
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos corinomicólicos	COOPER <i>et al</i> , 1988.
<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC	Lipídeo neutro	KOSARIC, 2001.
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	Glicolipídeo	VYAS & DAVE, 2011

3.2.2 Classificação por localização celular

Outra forma de classificar os CASs microbianos é pela localização celular (Figura 3.1). Segundo Alexander (1999), há três áreas onde podem se localizar os CASs microbianos: no espaço intracelular, incluindo lipídeos de membrana, no espaço

extracelular, onde se podem encontrar complexos de polissacarídeos-lipídeos e polipeptidolipídeos excretados, e na superfície celular interposta, localizada na parede celular, incluindo complexos lipídicos.

O local da produção do biossurfactante pode estar ligado com a sua função para o micro-organismo. Algumas bactérias que possuem CASs tem maior hidrofobicidade, o que poderia aumentar sua adesão a hidrocarbonetos (PANAGODA *et al*, 2001; VYAS *et al*, 2011).

Determinar a área onde se encontram CASs é importante para a escolha da técnica mais adequada de extração da molécula.

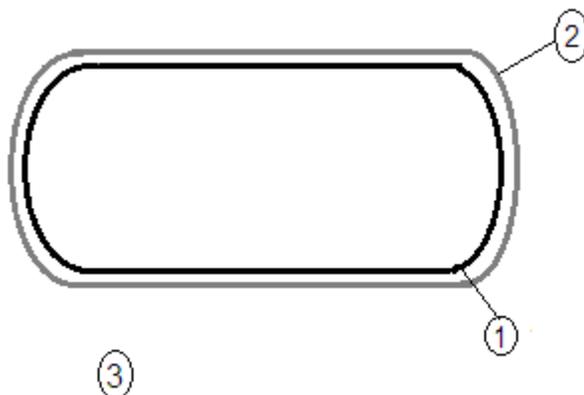


Figura 3.1. Classificação dos CASs microbianos de acordo com a localização celular em uma célula procariótica hipotética, onde: 1) intercelular; 2) superfície celular interposta; 3) extracelular

3.2.3 Classificação por características químicas

Quando abordamos a estrutura química de CASs, devemos primeiramente compreender que sua característica anfifílica é devido às duas porções que compõem

as moléculas: uma cauda hidrofóbica e uma porção hidrofílica, ligadas ou por uma ligação glicosídica, ou por uma ponte de amina (CAMEOTRA, MAKKAR, 2008). A partir dessa estrutura geral dos surfactantes microbianos, podemos subdividi-los de acordo com o peso molecular ou com grupos da fração polar. Quanto ao peso molecular, podem ser divididos em compostos de baixo peso molecular ou compostos de alto peso molecular, sendo que os primeiros estão ligados a uma alta redução da tensão superficial e interfacial, enquanto os de alto peso molecular estão relacionados a uma alta capacidade de formar emulsões (ROSENBERG, RON, 1999; ARAJI *et al*, 2007).

Os CASs microbianos podem ser divididos em cinco classes: glicolipídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, lipídeos neutros e ácidos graxos, biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados (DESAI, BANAT, 1997; LANG, 2002), representados na figura 3.2.

- **Lipopeptídeos:** os lipopeptídeos são moléculas formadas por uma porção hidrofílica composta por proteína e uma porção hidrofóbica composta por ácidos graxos. Possuem configuração cíclica na sua maioria (SMITH *et al*, 2010). O lipopeptídeo mais estudado é a surfactina, sendo metabólito secundário de espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, em especial linhagens de *Bacillus subtilis* (BARROS *et al*, 2007; FARIA, 2010). A surfactina é um biossurfactante de estrutura circular, e apresenta alta capacidade de diminuição de tensão superficial comparada a outros biossurfactantes e surfactantes sintéticos (ARIMA *et al*, 1968; BARROS *et al*, 2007) Além da surfactina, há outros lipopeptídeos, como a lichenisina, produzida por *Bacillus licheniformis* (YAKIMOV, 1990). Apesar de ser geralmente encontrada em *Bacillus*, já foram isolados lipopeptídeos de *Brevibacterium aureum* (KIRAN, 2010), de *Arthrobacter* sp. MIS38 (MORIKAWA *et al*, 1993), e de *Pseudomonas fluorescences* (SOUZA *et al*, 2003; JANEK *et al*, 2010).

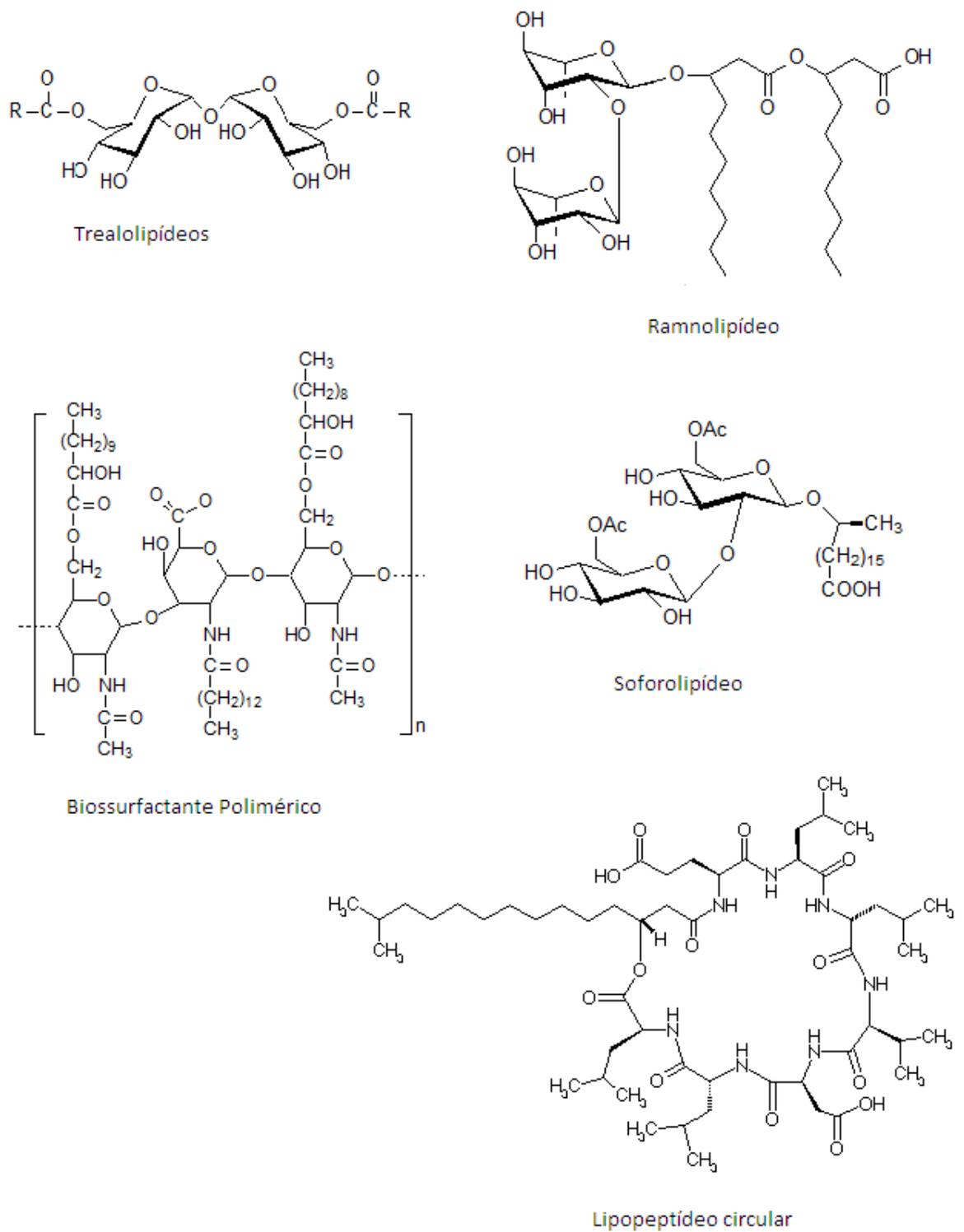


Figura 3.2. Estrutura de alguns surfactantes microbianos.

- **Glicolipídeos:** são biossurfactantes de baixo peso molecular, possuem uma cadeia hidrofílica composta por mono-, di-, ou polissacarídeos, ligados à porção hidrofóbica. Existem relatos de glicolipídeos produzidos tanto por bactérias, quanto por leveduras e fungos filamentosos. Entre as bactérias, o glicolipídeo mais estudado e já com aplicações industriais, são os ramnolipídeos, característicos de *Pseudomonas aeruginosa*, apesar de outras espécies também produzi-los (SOBERÓN-CHAVEZ *et al*, 2005). Os ramnolipídeos são compostos por uma cadeia de ácidos graxos, ligada a uma ou duas ramnosos. Também encontramos os trealolipídeos, produzidos por actinomicetos, como *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Gordonia* (SINGH, 2012). Os trealolipídeos apresentam na sua porção hidrofílica duas glicoses ligadas por uma ligação α - α -1,1 glicosídica. São derivados de ácidos micólicos, moléculas presentes na parede celular de actinomicetos, e são constituídos por cadeias longas de 3- hidroxil ácido graxo, substituídos na segunda posição por uma cadeia alifática (NISHIUKI *et al*, 1999). Por fim, outro grupo de glicolipídeos são os soforolipídeos, produzidos por fungos não patogênicos, como *Candida bambicola*, *Candida apicola*, *Wickerhamiella domercqiae*; *Pichia anomala*, *Rhodotorula bogoriensis* (VAN BOGAERT *et al*, 2011). Os soforolipídeos são compostos em sua porção hidrofílica pelo dissacarídeo soforose, uma diglicose com uma ligação não usual β - 1,2, que se liga à porção hidrofóbica por uma ligação β - glicosídica.

- **Fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros:** algumas bactérias e fungos secretam vesículas que contém esses compostos e, em meio extracelular, atuam como CASs. Os fosfolipídeos são componentes comuns de membranas celulares e quando secretados em formas de vesículas, podem aumentar a partição de componentes hidrofóbicos, como as vesículas excretadas por *Acinetobacter* sp HO1-N que podem ligar hexadecano às vesículas, formando microemulsões (KÄPELLI, FINNERTY, 1979). Em um estudo comparativo com a mesma linhagem cultivada em extrato de levedura e hexadecano, ocorreu um aumento considerável na concentração de fosfolipídios, tanto compondo a membrana como formando vesículas externas, passando de 49 $\mu\text{mol/g}$ de célula para 129 $\mu\text{mol/g}$. Também ocorreu aumento na concentração de ácidos graxos,

na forma de glicerídeos, o que também pode ser relacionado à atividade surfactante (MAKULA *et al*, 1975). Lipídeos neutros são secretados por *Nocardia erythropolis*, sendo capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial de meio contendo hidrocarbonetos (MACDONALD *et al*, 1981).

- **Biossurfactantes Poliméricos:** são moléculas de cadeias longas formadas por uma mistura de proteínas, lipídeos e carboidratos combinados entre si. O emulsan, produzido por linhagens de *Acinetobacter calcoaceticus* é o mais caracterizado e estudado. Tem um peso molecular de 1000 KDa, sendo um polissacarídeo constituído na sua porção hidrofílica por carboidratos, e na sua porção hidrofóbica por lipídeos. A ligação entre as duas porções dá-se via pontes ester e amida (KIM *et al*, 1997). Apresenta uma alta atividade emulsificante, em diferentes substratos, como óleo de soja, óleo de oliva e óleo bruto (CHAMANROKH *et al*, 2008). Kim (1997) e colaboradores sugerem que essa alta atividade esteja ligado ao tamanho das ramificações de carboidratos da porção hidrofílica.

- **Biossurfactantes particulados:** algumas bactérias possuem compostos em suas membranas ou paredes celulares que aumentam sua hidrofobicidade, atuando a própria célula ou vesículas como biossurfactante (DOROBANTU *et al*, 2004), e aumentando sua aderência a compostos hidrofóbicos (ROSENBERG, ROSENBERG, 1985; MOHEBALI *et al*, 2007). Como já citado acima, a bactéria *Acinetobacter* sp HO1-N produz vesículas que acumulam hidrocarbonetos e funcionam como emulsificantes (KÄPELLI, FINNERTY, 1979). A bactéria patogênica *Aeromonas salmonicida* produz a proteína A layer em seu envelope celular, aumentando sua hidrofobicidade. Em presença de eritrócitos, sua produção aumenta (ALSTINE *et al*, 1986). A membrana da arqueia *Halobacterium halobium* é composta por fitanil fosfatodil glicerol fosfato, uma molécula que difere dos ácidos graxos com ligações ester dos outros domínios biológicos, e que apresenta características anfífilas (POST, COLLINS, 1982).

3.3 Vantagens dos surfactantes microbianos

Os surfactantes microbianos possuem algumas propriedades similares aos surfactantes químicos, que os tornam potenciais substitutos aos compostos, e outras que lhes conferem vantagens sobre surfactantes químicos. Entre elas, pode-se citar: estabilidade a temperatura, pH e salinidade, atividade emulsificante, atividade de superfície e interface, biodegradabilidade e baixa toxicidade.

3.3.1 Estabilidade a temperatura, pH e salinidade

Muitos dos processos aos quais os biossurfactantes podem ser empregados constituem ambientes extremos de temperatura, pH, salinidade, ou devido à presença de metais pesados e compostos tóxicos e/ou carcinogênicos. Por isso, para a utilização dos surfactantes microbianos, é desejável que estes apresentem estabilidade e atividade em condições. A maioria dos estudos de caracterização de surfactantes microbianos avalia a sua estabilidade em diferentes condições, através de parâmetros como atividade emulsificante e tensão superficial e interfacial (FRANZETTI, 2007; KUSHIDA, 2000; MATSUURA, 2004; FARIA, 2010; CHANTHAMALEE, LUEPROMCHAI, 2012). Alguns estudos com actinomicetos reportam estabilidade a diferentes temperaturas e pH de surfactantes produzidos por *Nocardia sp.* L-417, que mantiveram os valores de tensão superficial em uma faixa de pH de 2-12 e à temperatura de 100°C por 3 horas (KIM *et al*, 2000), e por *Rhodococcus sp.* TA6, que não teve variações na atividade emulsificante e tensão superficial em pH de 4-10, temperaturas de 100°C e 125°C, e salinidades de 0-10% (SHAVANDI, 2011). Já um

lipopeptídeo produzido por *Nocardioopsis alba* MSA10, apresentou queda na atividade emulsificante em salinidades maiores de 1,5%, pH menores que 6 e maiores que 9 e temperaturas menores de 20°C (GANDHIMATHI, 2009). As condições ótimas para produção do surfactante microbiano e sua estabilidade provavelmente estão relacionada às condições ambientais naturais a que a linhagem produtora foi submetida. Pesquisas com espécies de *Pseudomonas* mostram alta estabilidade dos surfactantes produzidos. Um polissacarídeo produzido por *Pseudomonas oleovorans*, uma espécie capaz de produzir o surfactante a partir de glicerol puro, apresentou capacidade de estabilizar emulsões em hidrocarbonetos e óleos vegetais em variações de temperaturas (30-50°C), pH (2-12) e salinidade (0-2.0M). Porém, em temperaturas acima de 60°C, ocorreu uma redução da atividade emulsificante. Como pontuado pelos autores, a atividade emulsificante não depende somente do surfactante, como também do composto hidrofóbico utilizado (FREITAS *et al*, 2009). A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106 apresentou estabilidade a altas temperaturas, pH neutro e alcalino (6-10) e salinidade até 8% de NaCl (TECHAOEI *et al*, 2011). Visto a variedade de microrganismos produtores e de moléculas surfactantes, trabalhos que visem tanto isolar CASs quanto micro-organismos produtores são importantes para melhor compreensão e aplicação de CASs em processos biotecnológicos.

3.3.2 Atividade emulsificante

Os surfactantes microbianos, devido ao seu caráter anfifílico, têm a propriedade de formar emulsões água em óleo e óleo em água e estabilizá-las. Emulsões são sistemas heterogêneos compostos de duas fases, sendo uma imiscível ou parcialmente miscível, dispersa em uma fase contínua em forma de glóbulos com diâmetro de 1 a 10 µm (MULLIGAN, GIBBS, 1993). A atividade emulsificante depende, além do biosurfactante, das condições ambientais, das fases imiscíveis utilizadas e da

afinidade do CAS nessas fases. Para analisar-se a Atividade Emulsificante, é comum analisar-se também sua estabilidade a condições extremas e em diversos períodos de tempo (MATSUURA, 2004; SHAVANDI *et al*, 2011; KIM *et al*, 2000).

3.3.3 Atividade de superfície e interface

De acordo com Mulligan (2005), um bom surfactante reduz a tensão superficial da água de 75 para 35 mN/m e a tensão interfacial água/hexadecano de 40 para 1 mN/m. Relacionada à tensão superficial está a Concentração Micelar Crítica (CMC), que é a concentração mínima da molécula surfactante para começar a formação de micelas (MULLIGAN, GIBBS, 1993; MAKKAR, 2003; EDWARDS *et al*, 1991). Trabalhos reportam uma CMC menor de surfactantes microbianos em relação aos surfactantes químicos (CHANDRAM, DAS, 2011; MAKKAR, 2003), o que confere uma vantagem ambiental e econômica, pois utilizando menores quantidades do surfactante, há uma economia de material e uma menor quantidade de resíduo produzido.

3.3.4 Biodegradabilidade

Uma das preocupações que corroboram para a utilização de surfactantes microbianos, principalmente em biorremediação e recuperação de óleos, é sua biodegradação. A biodegradabilidade está relacionada ao risco ambiental que a molécula representa para aquele ambiente, sendo que surfactantes eficientes não podem ser compostos recalcitrantes no ambiente (BERNA *et al*, 2007). Poucos estudos reportam a biodegradação dos surfactantes microbianos, mesmo assim, a maioria

aponta que os CASs microbianos têm uma meia vida no ambiente menor que os surfactantes químicos. Em um estudo comparativo entre os surfactantes microbianos surfactina, fengicina, iturina, artrofactina e flavolipídeos e o surfactante sintético SDS, o último apresentou menor biodegradação tanto em solo quando em meio líquido, evidenciado por uma menor produção de CO₂ pelas linhagens degradadoras, o que indica a sua utilização como fonte de carbono (LIMA *et al*, 2011). Em um estudo comparativo entre soforolipídeos, surfactina e surfactantes químicos, as taxas de biodegradação dos surfactantes microbianos foram maiores que a dos surfactantes químicos (HIRATA *et al*, 2009). Devido à variedade de estruturas químicas, mais estudos devem ser feitos com outras moléculas quanto a essa propriedade.

3.3.5 Baixa toxicidade

Há poucos estudos restritos à toxicidade, sendo que a maioria faz parte de estudos abrangentes sobre aplicações das moléculas (KLOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, 2011). Alguns estudos fazem uma comparação entre CAS microbianos e surfactantes químicos. Com o teste de bioluminescência de *Vibrio fischeri*, um glicolipídeo de *Rhodococcus ruber* IEGM 231 apresentou IC₅₀ (Concentração inibitória 50%) em concentrações mil vezes maior que a do surfactante químico Inipol (IVISHINA *et al*, 1998). Em testes com sementes *Latuca sativa*, tanto os CAS microbianos quanto os surfactantes químicos não apresentaram toxicidade às sementes (MATSUURA, 2004). A margem de respostas de diferentes organismos a compostos tóxicos é variável e estudos com mais de um teste toxicológico são raros. Em um trabalho com fibroblasto de embrião de camundongo e *Daphnia similis*, a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* apresentou EC₅₀ (concentração efetiva mediana) em *Daphnia* acima de 1500 mg/mL, e não apresentou toxicidade aos fibroblastos nas concentrações de 1 a 150 g/mL (FARIA, 2010). Em estudos paralelos com *Daphnia*

similis, a EC_{50} apresentada pelos surfactantes sintéticos SDS e DTA foram de respectivamente 0,4 e 0,074 mg/mL (SANDBACKA *et al*, 2000), bem menor que o da surfactina. Portanto, os estudos até o momento têm reportado que surfactantes microbianos são menos tóxicos que surfactantes químicos.

3.4 Função biológica

Os surfactantes microbianos, apesar de serem generalizados em um único grupo, apresentam características muito diversas, como apontadas anteriormente. A diversidade de estruturas moleculares, características físicas e químicas, e a variedade de organismos produtores podem ser indícios de que os surfactantes microbianos podem ter diferentes funções fisiológicas uns dos outros.

Rosemberg e Ron (1999) propuseram três funções principais para bioemulsificantes: (I) aumentar a área de superfície de substratos hidrofóbicos imiscíveis em água, criando um microambiente que possibilitaria um aproveitamento dessas fontes de carbono; (II) aumentar a biodisponibilidade dos substratos hidrofóbicos pelo aumento da sua aparente solubilidade ou dessorção nas superfícies; (III) regular a adesão de micro-organismos a superfícies.

Alguns estudos apontam uma função facilitadora de infecções em biosurfactantes de micro-organismos patogênicos. Takayama (2005) e colaboradores concluíram que os ácidos micólicos presentes na parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*, além de contribuir para a integridade da parede, determinam sua virulência. Também é reportado que a proteína A *layer* em *Aeromonas salmonicida* seja um fator de virulência, que aumenta a hidrofobicidade celular e sua interação com diferentes interfaces (ALSTINE *et al*, 1986).

Em estudos com biossurfactantes isolados de bactérias do gênero *Lactobacillus*, foi observado que o biossurfactante em concentração de aproximadamente 100 µg/mL foi capaz de reduzir em 81% a formação de biofilme pela levedura *Candida albicans* (FRACCHIA, 2010). Em ratos, observou-se uma diminuição na infecção urogenital por *Staphylococcus aureus* quando tratado com um inóculo de *Lactobacillus paracasei*, bactéria presente na microbiota vaginal humana, sendo sugerido que a eficácia do inóculo deu-se pelo impedimento da colonização da mucosa vaginal por *S.aureus* (ZÁRATE, 2007). Essa produção de biossurfactantes, no gênero *Lactobacillus*, já foi sugerida como uma estratégia competitiva na microbiota vaginal contra microorganismos patogênicos, em conjunto com a produção de outras substâncias antimicrobianas (BORIS, BARBÉS, 2000; GIL *et al*, 2010).

3.5 Aplicações biotecnológicas

A característica anfifílica dos CASs é atrativa para várias aplicações em processos de produção. Sua baixa toxicidade comparada a surfactantes sintéticos, e a atividade emulsificante, possibilitam o uso na indústria alimentícia. Além de emulsificantes, também podem ser utilizados como antiadesivos e antimicrobianos. Como emulsificantes, poderiam ser aplicados em laticínios, como sorvetes e *cream-cheese*, visto que a consistência cremosa é uma das qualidades desejáveis desses produtos. Também há a possibilidade de aplicação em lugar de aditivos para aumentar a vida média de alimentos. Como antiadesivo, os biossurfactantes agem impedindo a formação de biofilmes em equipamentos e superfícies que tenham contato com o alimento a ser produzido (FREIRE *et al*, 2009; NITSCHKE, COSTA, 2007).

Na agricultura, aplicou-se biofungicidas à base de uma mistura de ramnolipídeos, que protegem *Nicotiana glutinosa* do fungo do mosaico do tabaco (DESAI, BANAT, 1997).

Outro campo de atuação é a indústria de cosméticos. Alguns biossurfactantes já estão em pesquisas avançadas para serem utilizados em produção de larga escala, como os sofrorlipídeos, os ramnolipídeos e os manosleritrol lipídeos. Suas características emulsificantes, aliadas a propriedades antimicrobianas os tornam interessantes para o desenvolvimento de cosméticos, tanto em loções faciais, cremes anti-rugas e contra acne, visto que aumentam a vida útil do produto e podem substituir surfactantes sintéticos, que apresentam menor afinidade à fisiologia da pele (WILLIANS, 2009).

Além dos usos industriais e para substituição de produtos em processos, uma área em expansão para a utilização de biossurfactantes tem sido os estudos em biorremediação. Experiências de sucesso, como na biorremediação do vazamento do navio cargueiro de Exxon Valdez, mostram que pesquisas na área serão promissoras (HARVEY *et al*, 1990). Entre os principais compostos constituintes do petróleo, encontramos uma fração de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, que podem ser imiscíveis em água. Muitos micro-organismos podem produzir biossurfactantes como uma forma de facilitar o acesso a essas fontes de carbono, diminuindo a tensão interfacial entre eles e a água (RON, ROSENBERG, 1999; PACWUA-PLOCINICZAK *et al*, 2011; BANAT *et al*, 2010).

A recuperação de óleos em geral também abriu espaço para o desenvolvimento da técnica de recuperação melhorada de petróleo por micro-organismos (MEOR). Os métodos tradicionais de recuperação de óleo têm uma eficácia de 40-50%, além da produção de resíduos como água de produção (RAMKRISHNA, 2008). O método MEOR, além de recuperar o petróleo residual, ainda é uma tecnologia viável do ponto de vista econômico (LAZAR, 2007). A tecnologia, de acordo com Banat (1995), pode ser aplicada de três formas: (I) inoculando-se o micro-organismo produtor do

surfactante direto nos reservatórios; (II) aplicando-se nutrientes nos reservatórios, que promovam o desenvolvimento da microbiota nativa para a produção de surfactantes, e (III) produzindo-se os CASs em reatores e aplicando-os nos reservatório. Apesar de algumas aplicações de campo relatadas com sucesso, a utilização de técnicas de MEOR ainda esbarra na pequena quantidade de estudos de aplicação em campo, sendo que a maior parte dos trabalhos realizados em escala laboratorial não é aplicável em escalas maiores (BROWN, 2010). Desta forma, apesar de promissora, a técnica ainda precisa de muitos avanços para ser aplicada com eficiência.

3.6 Fatores que afetam a produção de surfactantes microbianos

Vários fatores podem afetar a produção e o tipo de biossurfactante produzido, como: fonte de carbono utilizada para o cultivo, concentração de nitrogênio, de cátions monovalentes, além de condições de cultivo, como pH, temperatura, agitação (CAMEOTRA, MAKKAR, 1998).

Uma grande parte dos processos industriais trabalha com variáveis extremas de temperatura, pH, salinidade e pressão, como por exemplo na indústria alimentícia, onde utiliza-se altas ou baixas temperaturas para esterilização, ou a indústria petrolífera, que apresenta resíduos de alta salinidade e processos em altas pressões (MARGESIN, SCHINNER, 2001; LE BORGNE *et al*, 2008). Há muitos estudos sobre produção de biossurfactantes em ambientes moderados, porém poucos reportam a produção de biossurfactantes nesses ambientes extremos (CAMEOTRA, MAKKAR, 1998). Essas variáveis ambientais também estão presentes em áreas com vazamentos de petróleo. Em um estudo com bactérias isoladas de ambientes marinhos (salinos), uma linhagem de *Pseudomonas* sp apresentou uma atividade emulsificante de 70,5% em n-

hexadecano, e uma atividade em óleo pelo teste do deslocamento de 3,14 cm² (DAHIL, 2012).

Os surfactantes microbianos não seguem uma resposta única a variações ambientais. Em estudo com Emulsan, sua atividade emulsificante diminuía em pH alcalino, quando combinado a tampões salinos (ROSEMBERG *et al* 1979). Com um lipopeptídeo isolado de um actinomiceto, o biossurfactante manteve suas propriedades em diferentes pHs (4.0-13.0), temperaturas (25°C- 120°C) e salinidades (0-30% NaCl) (HOROWITZ *et al*, 1990).

Alguns estudos com ramnolipídeos apontam que elevadas razões Carbono/Nitrogênio e Carbono/Fósforo promovem a produção da molécula, enquanto altas concentrações de cátions, como de ferro, inibem sua produção (SOBERÓN-CHAVEZ *et al*, 2005; VENTAKA RAMANA, KARANTH 1989; MULIGAN, 1989). Khopade (2012), e colaboradores chegaram a uma razão C/N ótima de 2:1 para a produção de biossurfactante pela bactéria marinha *Nocardiosis* B4. Em concentrações maiores ou menores, a atividade emulsificante e a capacidade de diminuir a tensão superficial do meio eram menores, indicando uma menor produção do biossurfactante. Esses dados contradizem com Guerra-Santos (1984), em que um meio limitante em nitrogênio proporcionou uma maior produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. Em escala laboratorial, foram testados resíduos de óleo de girassol e de oliva para a produção de ramnolipídeos. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 produziu 2,7 g/L do biossurfactante, quando cultivada em meio mineral contendo 40 g/L de fonte da fonte de carbono, e uma relação C/N de 8, a temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm (HABA *et al*, 1999).

O trabalho que relata maior produção de biossurfactantes foi realizado com *Candida bombicola*, a qual é capaz de produzir 300-400 g/L de soforolipídeos a partir de uma mistura de fonte de glicose e óleo vegetal, diminuindo a tensão superficial de 40 para 25 N/m (LANG, 2002).

Kushida (2000) e Matssura (2004), em trabalhos com a mesma linhagem utilizada nesse estudo, apresentaram concentrações finais do Extrato Bruto Liofilizado (EBL) diferentes. No primeiro estudo foi obtido 0,38g/L do EBL à partir do crescimento de *Gordonia amicalis* em meio contendo 1,5% de óleo de oliva, extrato de levedura e peptona como fontes de carbono e nitrogênio. Matsuura(2004) obteve 0,28% do EBL quando a mesma bactéria foi cultivada em meio com 10% de diesel como fonte de carbono.Em fermentador, Matsuura (2004) aumento a produção do EBL para 0,53 g/L. Assim, dois estudos com a mesma linhagem apresentaram uma concentração final de biossurfactante produzido variando-se somente a fonte de carbono. A produção só poderá ser otimizada após se avaliar as condições ideais de cultivo dos micro-organismos produtores.

3.7 Otimização e viabilidade econômica da produção

Os maiores empecilhos para a produção de biossurfactantes ainda são o seu preço elevado e a baixa produtividade. Visando reduzir custos da produção, ocorre uma procura por estratégias em que a fonte de nutrientes seja mais viável economicamente, como a utilização de resíduos, e a produção do biossurfactante seja otimizada por melhorias no processo ou por utilização de linhagens recombinantes ou selecionadas (MAKKAR *et al*, 2011; FARIA, 2010; SYLDATK, HAUSMANN, 2010). Vários estudos têm utilizado resíduos como substratos para a produção de biossurfactante, podendo ser destacado a utilização de glicerina residual, melão de cana, resíduos de óleos vegetais, esgoto doméstico (MAKKAR *et al*, 2011; KOSARIC, 1992; FARIA, 2010).

O glicerol é um resíduo da produção de biodiesel, e a preocupação com sua recuperação tem aumentado com a substituição de combustíveis fósseis por fontes

alternativas (da SILVA *et al*, 2009). Resíduos agroindustriais ou de processamento de alimentos também podem ser algumas alternativas (KOSARIC, 1992).

Kosaric (1992) sugere duas estratégias para aumento e barateamento da produção. Na primeira, utilizando resíduo rico em açúcares, aumentou-se a produção de biossurfactante com o co-cultivo de uma espécie de bactéria ou fungo lipogênico e uma espécie de alga lipogênica, que produziram células ricas em triglicérides, utilizando o resíduo como fonte de carbono. O fungo *Torulopsis bombicola* pode então aproveitar tanto o açúcar como as células ricas em triglicérides para a produção de soforolipídeos. O estudo mostrou um aumento de 600% na produção comparado ao cultivo sem co-cultura. A segunda estratégia utilizada foi o barateamento a partir da utilização de esgoto doméstico que, além de ser viável economicamente, é uma forma de tratamento de efluentes.

Apesar de experiências com sucesso em escala laboratorial, Makkar (2011) pontua o fato de alguns problemas na produção de biossurfactantes a partir de resíduos, como o excesso ou falta de nutrientes no resíduo, que torna o processo difícil de ser otimizado para o crescimento das células. Além disso, o tipo de biossurfactante produzido poder variar com a fonte de nutrientes utilizada (VAN BOGAERT *et al*, 2011), podendo afetar também a produção à partir da variação no crescimento celular. Chamanrock (2008) também pontua que a fonte de carbono é tida como um dos principais fatores que interferem na produção de um surfactante microbiano, o que também constitui uma desvantagem à utilização de resíduos agroindustriais ou de efluentes domésticos, que apresentam variações de acordo com flutuações da produção.

Em resíduos de óleo lubrificante de motor e borra de óleo de amendoim, ocorreu a produção de um lipopeptídeo por *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar de a produção ter atingido o máximo de 4,37 mg/mL, o biossurfactante produzido apresentou uma atividade emulsificante maior que Triton-X, e os resíduos puderam ser assimilados pela bactéria para seu crescimento (THAVASI *et al*, 2011).

3.8 Métodos de Isolamento de bactérias produtoras de Biossurfactantes

Existem vários métodos reportados na literatura para selecionar e isolar linhagens produtoras de biossurfactantes, utilizando propriedades dos biossurfactantes para seu rastreamento (DEASAI, BANAT, 1997). Utilizam-se métodos quantitativos e/ou qualitativos, sendo os qualitativos suficientes para uma triagem inicial. Dentre os mais utilizados, pode-se citar: método da atividade hemolítica, teste do deslocamento de óleo, medidas de tensão superficial e interfacial, *screening* para produção de lipase (GANDHIMATHI *et al*, 2009), atividade emulsificante da amostra (COOPER & GOLDENBERG, 1987), teste da penetração (WALTER *et al*, 2000), solubilização de antraceno cristalino (WALTER *et al*, 2000), teste CTAB (SIEGMUND, WAGNER, 1991), teste do colapso da gota (YOUSSEF *et al*, 2004).

As medidas de tensão superficial e interfacial diretas podem ser realizadas por diversos métodos, sendo o método do Anel Du-Noyu mais frequentemente aplicado. Ele consiste no cálculo da força necessária para separar um anel de platina da superfície. A força necessária é correspondente a tensão superficial do líquido. (WALTER *et al*, 2008; FARIA 2010).

O método da atividade hemolítica representa uma forma qualitativa e visual de se identificar bactérias produtoras de biossurfactantes. O cultivo em Ágar sangue, quando colonizado por bactérias que produzem biossurfactantes, forma um halo claro ao redor das colônias, indicativo da lise de eritrócitos. Vários estudos têm utilizado esse método como forma de triagem inicial e como uma forma visual da produção de biossurfactantes (ANANDARAJ, THIVAKARAN, 2010).

No teste do colapso da gota, uma gota do caldo celular é colocada em uma superfície contendo uma gota de óleo. Gotas contendo o surfactante colapsam, enquanto gotas sem a molécula permanecem intactas (TUGRUL, CANSUNAR, 2005).

O método CTAB foi desenvolvido por Siegmund e Wagner (1991) para identificação de surfactantes iônicos. A bactéria de interesse é cultivada em meio contendo agar CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) e, com a produção de biossurfactante, é criado um halo ao redor da cultura. Isso ocorre devido a formação de um par iônico insolúvel entre o biossurfactante aniônico e o tensoativo catiônico, CTAB. Devido à toxicidade do CTAB para algumas espécies, em casos negativos pode-se realizar o método substituindo CTAB por CaCl_2 ou $\text{Al}(\text{OH})_3$. Outro para medição de cargas superficiais é o potencial zeta, uma técnica mais rápida, que determina o potencial eletrostático na interface sólido-líquido (SZE *et al*, 2003).

3.9 O gênero *Gordonia*

Espécies do gênero *Gordonia* são bactérias gram-positivas pertencente ao grupo dos actinomicetos. Os actinomicetos possuem como uma de suas características a presença de ácidos micólicos constituintes da parede celular. Uma das formas de distinção entre espécies é justamente o estudo desses ácidos micólicos, que possuem diferente constituição em relação ao número de carbono e de duplas ligações. O gênero *Gordonia*, em estudo com análise de ácidos micólicos por cromatografia capilar acoplada à espectrometria de massas, apresentou diferenças na estrutura dessas moléculas (NISHIUKI *et al*, 1999). Essa estrutura pode variar em diferentes fases da cinética microbiana em uma mesma espécie (LAVAL *et al*, 2001).

Até o presente, o gênero agrupa 34 espécies descritas (EUZÉBY, 2012), tendo sido incluídas 2 espécies após um ano de submissão de uma revisão bibliográfica sobre o tema (DRZYZGA, 2012).

As espécies identificadas do gênero até o momento já apresentaram possibilidades de aplicações biotecnológicas em diversas áreas, como degradação de HPAs (hidrocarbonetos poliaromáticos) (XU *et al*, 2011), alquilpiridinas (STOBDAN *et al*, 2008), borrachas (ARENSKÖTTER *et al*, 2004) e biodessulfurização de combustíveis (ABAD *et al*, 2003). A produção de CASs também foi estudada. Alguns estudos reportam a participação de *G. amarae* em processos de formação de espuma em plantas de tratamento de efluentes, através da produção de biossurfactantes (DE LOS REYS *et al*, 1998 a,b & PAGILLA *et al*, 2002). *Gordonia* sp. BS29 foi capaz de produzir um biossurfactante de natureza glicolipídica quando crescida em meio contendo hidrocarbonetos alifáticos (FRANZETTI, 2007). Devido à diversidade metabólica do gênero, estudos que viabilizem o acesso aos seus produtos metabólicos e a um maior conhecimento do gênero são promissores para processos biotecnológicos.

3.10 Isolamento e purificação de biossurfactantes

A utilização de biossurfactantes isolados ao invés do inóculo de bactérias produtoras é uma das estratégias que podem ser utilizadas em processos como o MEOR (BANAT, 1995). O inóculo do biossurfactante tem a vantagem de não necessitar de uma linhagem adaptada ao ambiente e a variações drásticas de temperatura, pH, salinidade, e para processos biotecnológicos com indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias.

As técnicas para isolamento, purificação e caracterização podem ir desde simples métodos colorimétricos, que darão informações sobre a natureza química de seus

constituintes, até a utilização de espectrometria de massas e infravermelho, que darão informações sobre a estrutura da molécula (SMITH *et al*, 2010).

Para extrair e purificar biossurfactantes há diversos métodos, sendo que a escolha deve levar em consideração volume de amostra, molécula a ser isolada, custos em nível industrial e aplicação almejada. Entre os métodos mais utilizados, podemos citar precipitação ácida (muito utilizada para isolamento de surfactina), precipitação com solventes orgânicos, como metanol clorofórmio (KIM *et al*, 2000; KUSHIDA, 2000; MATSURA, 2004) e acetona (FREITAS, 2009); assim como a precipitação através da adição de sais, como descrito com sulfato de amônio para isolamento de Alasan (NAVON-VENEZIA *et al*, 1995) e fracionamento da espuma (COOPER, 1981). Para a retirada de CASs de membranas ou paredes celulares, pode-se utilizar sonicação (KUYUKINA *et al*, 2001) ou hidrólise com KOH (NISHIUCHI *et al*, 1999). O método com metanol-clorofórmio é o mais utilizado, porém, como pontuado por Kuyukina, esse método é custoso e apresenta alta toxicidade e risco ambiental (KUYUKINA *et al*, 2001). Kuyukina (2001) e colaboradores testaram o metil éter butil terciário para extração de biossurfactantes de espécies de *Rhodococcus*, apresentando uma extração de 10 g/L da molécula, mostrando que esse método é tão eficiente quanto outros de extração com solventes, e apresenta uma menor toxicidade (KUYUKINA *et al*; 2001).

A ultrafiltração foi utilizada com sucesso para isolamento de ramnolipídeos e surfactina. Devido à baixa CMC de ambos, as micelas formadas ficam retidas durante a filtração, e pequenos aminoácidos, açúcares e fosfatos passam pelas membranas (MULLIGAN, GIBBS, 1990).

3.11 Caracterização química

A caracterização química de biossurfactantes pode ser feita utilizando uma gama de metodologias. Nos últimos anos, houve um avanço nessas técnicas, o que tem permitido análises mais econômicas, rápidas, e com pequenas amostras. Podemos citar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensional, Espectroscopia no Infravermelho (IV), Espectrometria de Massa (FAB-MS, MALDI-TOF e ESI/MS-MS) (PEYPOUX *et al*, 1999).

A CLAE tem sido utilizado como opção para se analisar concentração, natureza química e polaridade das moléculas. Freitas (2009) e colaboradores utilizaram HPLC para identificação de açúcares de um exopolissacarídeo extracelular, através da utilização da coluna CarboPac PA10, específica para identificação de mono e dissacarídeos, e com a eluição da amostra em NaOH, com um detector amperométrico. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, com coluna capilar, foi utilizada para análises de ácidos micólicos. Essa metodologia permitiu caracterizar os ácidos micólicos em 3 parâmetros: o grau de insaturação, o número médio de carbonos e a estrutura da ramificação α -alquila. A metodologia utilizada mostrou-se uma ferramenta importante para estudos de identificação e caracterização de ácidos micólicos. Em amostras com micro-organismos do gênero *Nocardia*, essa metodologia permite a distinção entre *N. asteroides* e *N. farcinica*, duas espécies patogênicas, de difícil diferenciação por métodos convencionais (NISHIUKI *et al*, 1999, 2000). Para análise de ácidos micólicos, Laval (2010), e colaboradores demonstraram que Espectrometria de massas de Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser é um método rápido e sensível para a identificação de ácidos micólicos, capaz de diferenciar moléculas produzidas pela mesma linhagem em fases de crescimento celular distintas. O mesmo método também foi capaz de revelar a presença de três complexos de lipopeptídios em *Bacillus subtilis*: surfactinas, iturinas e fengicinas (VATER *et al*, 2002).

Através da Espectrometria no Infravermelho com transformação de Fourier (FT-IR), uma ferramenta qualitativa para análise de grupos funcionais, pode-se inferir que os CAS de *Gordonia amicalis*, produzido à partir de óleo de oliva, não se tratava de um lipopeptídeo e nem de um glicolípido. Juntamente com análises de Ressonância Magnética (RMN) e Espectrometria de Massas de alta Resolução Q-TOF, foi concluído que os CAS eram uma mistura de oligômeros de baixo peso molecular (MATSUURA, 2004). A Espectrometria de Ressonância Magnética (RMN) é comumente utilizada para diferenciação de isomorfos. Bayoumi (2010), e colaboradores identificaram os aminoácidos de um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* utilizando essa técnica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo utilizado

Para esse estudo, foi utilizada a bactéria anteriormente descrita como *Planococcus citreus*, da coleção de culturas do LSFM. A linhagem foi isolada, em um estudo anterior, de amostras de solos contaminados com hidrocarbonetos, coletados próximo à Refinaria de óleo de Paulínia (KUSHIDA, 2000).

4.2 Análise da sequência do gene ribossomal 16S da linhagem isolada

Em estudos anteriores, a caracterização e identificação inicial da linhagem foram baseadas em aspectos bioquímicos e morfológicos, sem análises filogenéticas (JACOBUCCI *et al*, 2001). Sendo assim, para uma identificação correta, o DNA total do micro-organismo isolado foi extraído e purificado com kit de extração de DNA genômico da Qiagen (Qiagen, CA, EUA), segundo especificações do fabricante. Foram utilizados os primers p 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (M = A or C) e p 1401R (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3'), para amplificação do gene ribossomal 16S. A reação de polimerização foi preparada adicionando-se: 100 ng do DNA total, 2 U da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen®), 0,2 mM de trifosfato deoxinucleosídeo e 0,4 μ M de cada primer, em um volume final 50 μ L da reação. As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C/2 min; desnaturação 10 ciclos de 94°C/1min, anelamento 55°C/30seg, extensão 72°C/3 min.

Amplicons do DNAr foram purificados (kit de purificação GFX PCR DNA e kit de purificação Gel Band GE Health Care, EUA) e sequenciados utilizando o sistema de sequenciamento automático MegaBACE (1000 GE Health Care, EUA). A reação de sequenciamento foi feita utilizando-se o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing, de acordo com as especificações do fabricante. A sequência obtida foi alinhada com a Ribosomal Database Project (RDP), utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al*, 1994) e análises filogenéticas utilizando o software MEGA 2001 (KUMAR *et al*, 2004). A matriz de distância evolutiva foi calculada utilizando o modelo de Kimura (1980). A árvore filogenética foi obtida utilizando-se o algoritmo *neighbour-joining* (SAITOU, NEI, 1987), utilizando-se valores de *bootstrap* a partir de 1000 re-amostragens.

4.3 Meio de cultivo

Os cultivos foram realizados em meio GYP, tanto em cultivo líquido quanto sólido (acrescido de 1,8% p/v de Agar).

Tabela 4.1. Meio GYP, modificado de Kushida (2000).

Constituinte	Concentração (% em p/v)
Glicose	2,0
Extrato de Levedura	0,5
Peptona	1,0
NaCl	1,0

4.4 Manutenção e pré-inóculo da cultura

A cultura foi preservada em Meio GYP sólido, sob-refrigeração de 4^º C, sendo periodicamente transferida de placas.

Para o pré-inóculo, culturas estoque eram transferidas para placas contendo meio GYP sólido, e incubadas a 30^ºC por 48 horas. A seguir, foram transferidas para 100 mL de meio GYP líquido, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, e incubadas a 30^ºC, em agitação de 150 rpm, por 24 horas.

4.5 *Screening* inicial para a produção de surfactante microbiano

Inicialmente, foram testadas diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a produção do surfactante microbiano pela linhagem em estudo. Foram utilizados diversos resíduos agroindustriais, a saber: melaço de cana 2% v/v, soro de ricota bruto, diesel 2%v/v, diesel 2% v/v acrescido de 0,06% m/v de extrato de levedura, efluente fenolado 10% v/v, óleo de fritura 2% v/v, glicerol 2% v/v. As diluições dos efluentes foram feitas no Meio Mineral basal, acrescido de solução de vitaminas (WOLIN, 1963) e elementos-traço (DYALL, SMITH, 2009). O meio com os diferentes substratos, em um volume final de 50 mL, colocados em frascos Erlenmeyers de 125 mL, foram autoclavados a 120^ºC por 15 minutos, com exceção da solução de vitaminas e elementos-traço, que foram filtrados com membrana milipore de 0,22 µm, e adicionados ao meio autoclavado, e resfriado a temperatura ambiente, somente no momento do inóculo.

4.6 Cultivo para a produção de biossurfactantes

O produto do pré-inóculo foi centrifugado a 9000 rpm, a uma temperatura de 4º, por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi suspenso em meio GYP. Foi avaliada a densidade ótica por espectrometria UV-vis (espectrofotômetro Shimadzu 2101), a um comprimento de onda de 600 nm. O inóculo foi feito com uma OD inicial 0,2, e o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer contendo 500 mL do meio GYP, a uma temperatura de 30°C, a agitação de 150 rpm, durante 14 dias.

4.6.1 Cinética do crescimento

A cinética de crescimento foi avaliada a partir de medidas de densidade ótica (DO) do caldo, a um comprimento de onda de 600 nm, e da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de Petri com meio GYP. Mediu-se também a variação de pH do meio durante o experimento. Para se avaliar a produção de biossurfactantes, avaliou-se a tensão superficial do meio, utilizando para isso a técnica do Anel de Nouy (Tensiômetro K10S Krüss). As medições foram realizadas de 3 em 3 horas durante as primeiras 24 horas, espaçando para 12 em 12 horas até 120 horas e de 24 em 24 horas até 240 horas.

4.6.1.1 Parâmetros avaliados

4.6.1.1.1 Densidade óptica

Foi analisada conforme descrito no item 3.5.

4.6.1.1.2 Unidades formadoras de colônias

Foi retirado 1 mL de cada amostra e transferido para tubos com 9 mL de água peptonada (0,1 %). As amostras foram diluídas até 10^{-8} . Foi coletado 1 mL de cada diluição, e plaqueado por método de semeadura de superfície, em meio GYP sólido. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas, e posteriormente foi contado o número de colônias, e utilizada a fórmula abaixo para o cálculo de UFC (KOCH *apud* Barbosa *et al*, 1995):

$$\text{n}^{\circ} \text{ UFC} = (\text{n}^{\circ} \text{ colônias}) \times (\text{valor diluição}) \times 500$$

4.6.1.1.3 pH

O pH das amostras do EBLC foi determinado diretamente utilizando-se pHmetro (TEC 2, Tecanalise).

4.6.1.1.4 Tensão superficial

Utilizou-se o tensiômetro Easy Dyne Krüss para as medidas. Para a análise, o meio foi centrifugado a 9000 rpm, a 4°C, por 20 minutos. Utilizou-se o sobrenadante para a análise e descartou-se o botão celular.

4.7 Extração e purificação dos biossurfactantes

Após o período de cultivo, as amostras foram centrifugadas a 9000 rpm, a 4°C, por 20 minutos, o pelete foi descartado, e o sobrenadante foi utilizado para extração dos biossurfactantes. A extração foi realizada com sulfato de amônio (Merck) a 65% p/v, segundo descrito por Navon-Venezia (1995) e colaboradores. Após adição do composto, a solução ficou em repouso a 4°C por 24 horas. A seguir o conteúdo foi centrifugado a 12000 rpm, a 4°C, por 90 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi colocado em membranas para diálise com água desmineralizada. Foram realizadas diversas trocas de água até remoção de todo o sal.

O extrato livre de células foi desidratado em rota evaporador e estocado em atmosfera anóxica para posterior caracterização.

Para purificação, foram utilizadas placas de TLC de sílica 60 Merck. A amostra foi diluída em metanol, na concentração de 25 mg/mL. Foram aplicados 10 µL da amostra na placa, e a corrida foi realizada com a fase móvel de metanol: clorofórmio: hidróxido de amônio 25%: água (65:25:15:10), padronizada no laboratório. Os “shots” foram revelados em luz UV, e com o auxílio de uma espátula, foram retirados da placa e

suspensos na fase móvel. A sílica residual precipitada foi retirada por filtração com membrana de 0,22 μm e o sobrenadante passou por rotaevaporação para retirada da fase móvel. O extrato purificado foi então utilizado para a caracterização química.

4.8 Caracterização Química do CAS

4.8.1 Análise do extrato bruto por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A caracterização qualitativa inicial deu-se pela análise do extrato bruto por Cromatografia de Camada Delgada. Foi realizado o procedimento de acordo com o item 3.6.

Procedeu-se com a utilização de reveladores para a identificação bioquímica da molécula:

- Ninhidrina (0,2% em acetona): para visualização de grupos amino. A placa foi borrifada com o revelador e aquecida a 100°C por 5 minutos (DITMER & LESTER, 1964);
- Ácido Sulfúrico 6 N: visualização de aminoácidos e outros grupos orgânicos presentes no extrato bruto. A placa foi visualizada após aquecimento a 100°C por 10 minutos (HOROWITZ *et al*, 1990).
- A placa também foi previamente exposta à luz UV, para visualização da localização de bandas.

4.8.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformado de Fourier (IR-TF)

Para esta análise, 0,1 mg da amostra foi misturada a 100 mg de brometo de potássio (KBr), macerada e prensada na forma de pastilha, sendo os espectros expressos de 500-4000 cm^{-1} . Foi utilizado o espectrofotômetro FTLA2000, e as análises realizadas no Laboratório de Química do Estado Sólido (IQ- UNICAMP).

4.9 Propriedade do CAS

4.9.1 Atividade emulsificante

Para avaliar a atividade emulsificante, incubou-se por 7 dias a bactéria, em meio GYP, a 30°C, com rotação de 150 rpm. O caldo foi centrifugado, conforme descrito no item 3.5. O sobrenadante livre de células foi utilizado para a avaliação de produção através de atividade de emulsificação do tipo água em óleo (A/O) (COOPER, GOLDENBERG, 1987) e óleo em água (O/A) (JOHNSON *et al*, 1992). Foram testados diferentes substratos: óleo de fritura, óleo diesel, óleo de mamona, efluente fenolado, óleo de ricota, hexadecano, hexadeceno, tolueno, tridecano, trideceno, tetradecano, água de produção de petróleo, pristano, fenol, glicerina purificada, glicerina bruta. Em tubos de ensaio, foram colocados 3,5 mL do extrato bruto livre de células e 2,0 mL do substrato. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 610 nm. As amostras foram agitadas em vortex por 1 minuto e deixadas em repouso. A absorbância da mistura foi medida novamente após 1 hora de descanso e a emulsão foi medida após 24 horas.

4.9.1.1 Estabilidade a temperatura, pH, salinidade e tempo de cultivo

Para analisar a estabilidade do biossurfactante em diferentes condições, foi utilizada a atividade emulsificante como padrão, conforme descrito no item anterior. Foi analisada a atividade emulsificante em temperaturas de 25°C, 50°C, 75°C e 100°C; pH 2, 4, 6, 8 e 10; concentração de NaCl de 5%, 10% e 15%; e tempo de cultivo de 7 e 14 dias.

4.9.2 Análise de Ângulo de Contato

Para a análise, a amostra do CAS purificado foi diluída em água deionizada, em uma concentração final de 10 mg/mL. O ângulo de contato foi testado utilizando-se o CAS diluído e água deionizada pura, como controle, no equipamento Easy Drop (KRÜSS). Foi utilizada uma seringa de capacidade de 4,5 mL para a produção de gotas, com uma vazão de 60 µl/min. A interação da água com a superfície foi captada por câmera fotográfica, e o valor do ângulo foi calculado utilizando-se o software DAS, com 15 medições a cada 10 segundos. Como superfícies sólidas, foram utilizados: placa de politetrafluoretileno (PTFE ou teflon), placa metálica do suporte do equipamento e lâmina de vidro.

4.9.3 Potencial Zeta

O Potencial Zeta foi obtido pelo equipamento Malvern Zeta Sizer- Nano. As amostras foram diluídas em água deionizada, em uma concentração final da suspensão de 1 mg/mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da sequência do gene ribossomal 16S do isolado

A sequência do gene RNAr 16S (1293 bp) obtida, quando comparada à base de dados, apresentou 100% de similaridade com *Gordonia amicalis* isolada e identificada como um actinomiceto dessulfurizante de d-benzotiofeno (11, 16S sequência do Genebank ID AF101418.1, identificador RDP [S000428902](http://rdp.cme.msu.edu/)). A figura 5.1 mostra uma árvore filogenética baseada no alinhamento da sequência do gene RNAr 16S do isolado e outras sequências de *Gordonia* obtidas da base de dados do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

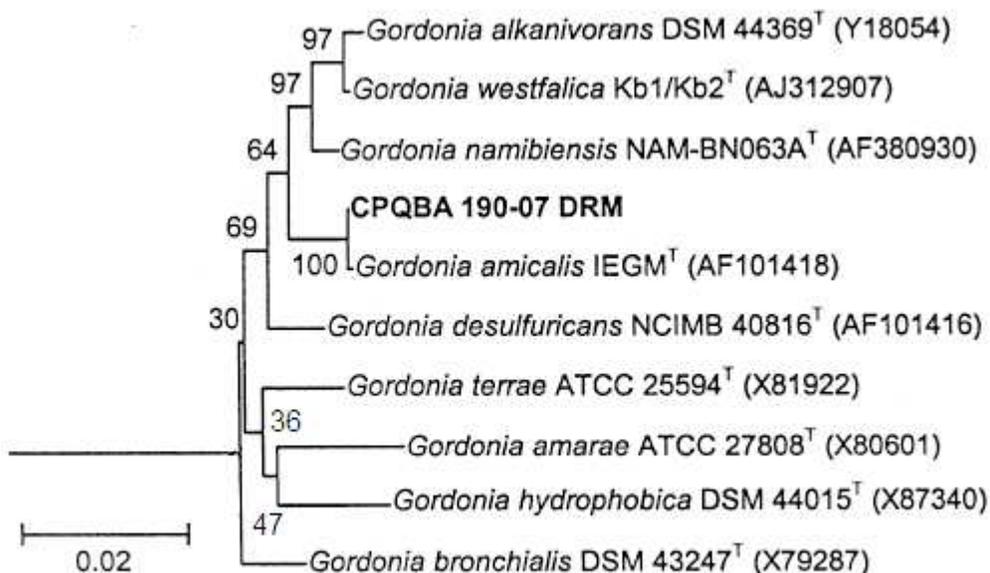


Figura 5.1. Árvore filogenética da sequência de RNAr 16S da bactéria *Gordonia amicalis* isolada (indicada como CPQBA 190-07 DRM) e sequências de outras espécies de *Gordonia* obtidas de bases de dados. Os números nas árvores são valores de bootstrap. A distância é indicada na escala.

5.2 **Screening** inicial para a produção de surfactante microbiano

Com exceção do meio contendo óleo de fritura, todos os outros meios apresentaram turvação, o que é um indicativo de crescimento celular. Porém, não apresentaram atividade emulsificante dos tipos A/O e O/A. Supõe-se que o micro-organismo pode utilizar as fontes de nutrientes, porém, nas condições utilizadas, não foi capaz de produzir CAS. Kosaric (1992) pontua que um dos maiores desafios à utilização de resíduos para a produção de biossurfactantes são as necessidades nutricionais dos micro-organismos, que podem necessitar de nutrientes ou não tolerar excessos presentes em resíduos. A linhagem de *Gordonia amicalis* utilizada neste estudo não foi capaz de produzir CAS de forma significativa quando cultivada em querosene (KUSHIDA, 2000). No estudo de Matsuura (2004), a mesma linhagem apresentou produção de biossurfactante quando cultivada em meio contendo extrato de levedura (1 g/L), peptona (0,3 g/L), MgSO₄ · 7H₂O (0,5 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), NaNO₃ (3 g/L), e 10% de óleo diesel, a temperatura de 30°C, a 150 rpm, por 96 horas. Portanto, em meio rico em nutrientes, a linhagem bacteriana foi capaz de produzir um CAS.

Devido aos resultados apresentados, optamos por estudar a produção de CAS por *Gordonia amicalis* no meio sintético GYP, rico em sacarídeos. Apesar de meios sintéticos com açúcar serem mais caros que meios ricos em óleos e hidrocarbonetos, há algumas vantagens, como: menor necessidade de resfriamento do biorreator, equipamentos mais simples, e não apresentam hidrocarbonetos residuais (GUERRA-SANTOS *et al*, 1986). No trabalho de Guerra-Santos e colaboradores, a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* foi máxima em uma concentração de glicose de 73 g/L (GUERRA-SANTOS *et al*, 1986). Também há a possibilidade de futuros estudos utilizando resíduos de baixo custo, ricos em açúcares, como resíduos da produção de cana-de-açúcar.

5.3 Cinética do Crescimento

Durante 10 dias, foram analisados o pH, crescimento microbiano por UFC e DO, tensão superficial e densidade óptica do micro-organismo crescido em meio GYP. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 e nas Tabelas 8.1 e 8.2 dos Anexos.

5.3.1 Unidades formadoras de colônia

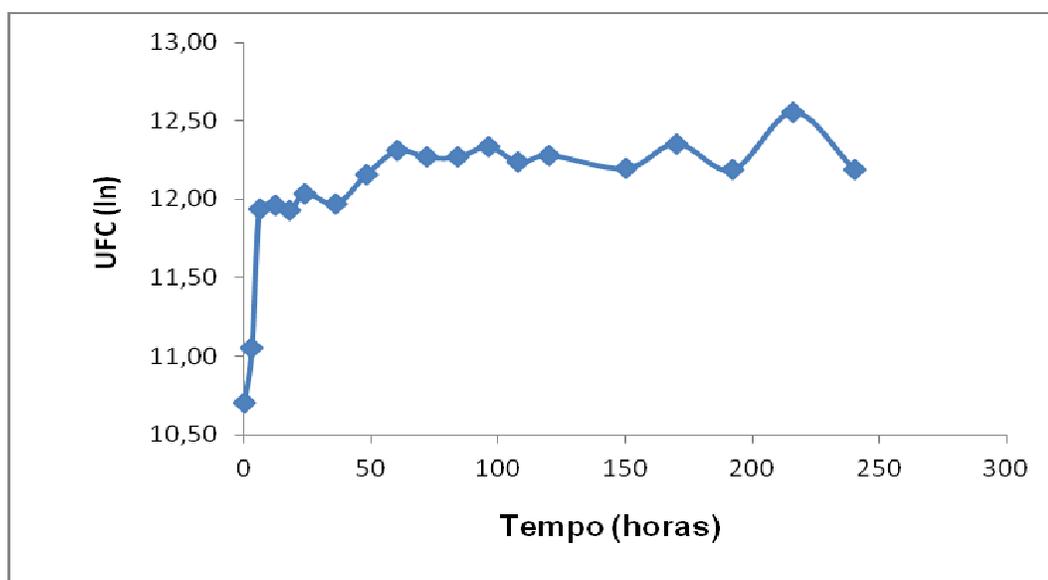


Figura 5.2: Variação do número de UFC durante o crescimento de *Gordonia amicalis* em meio GYP para a produção de CAS.

Pela análise dos dados obtidos, em meio GYP, a bactéria *Gordonia amicalis* não apresentou fase lag e a partir de 6 horas já estava em fase estacionária, que permaneceu até o fim do experimento. O meio rico em nutrientes e o pré-inóculo anterior ao cultivo de produção podem ter facilitado o crescimento. Outros estudos com a mesma linhagem não apresentaram dados de cinética para comparação (KUSHIDA, 2000; MATSSURA, 2004), e são poucos os trabalhos que utilizam a cinética de crescimento como parâmetro. Mesmo assim, vários estudos relacionam a produção do biossurfactante à fase do crescimento. Khopade (2012), e colaboradores encontraram uma maior produção de biossurfactante por um actinomiceto durante a fase exponencial, indicando ser um metabólito primário. Sua produção decaiu na fase estacionária. Biossurfactantes como metabólitos primários também foram relatados em um trabalho envolvendo quatro linhagens bacterianas e de uma linhagem de levedura, *Corynebacterium* sp. DDV1, *Flavobacterium* sp. DDV2, *Micrococcus roseus* DDV3, *Pseudomonas aeruginosa* DDV4 e *Saccharomyces cerevisiae* DDV5, onde o crescimento aumentou juntamente com a atividade emulsificante (ADEBUSOYE *et al*, 2008). O estudo corrobora com um trabalho com biossurfactantes de *Lactobacillus* sp, produzido em maior quantidade na metade da fase exponencial (FRACCHIA, 2010). Já em um trabalho com *Pseudomonas aeruginosa*, a produção de biossurfactante aumentou durante a fase estacionária. Nesse caso, a molécula seria um metabólito secundário (BABU *et al*, 1996). Saharan (2011) afirma que há uma associação entre a produção dos compostos ativos de superfície e o crescimento bacteriano. Essa relação varia para cada espécie, por isso a necessidade de se traçar a cinética de crescimento juntamente com as análises da produção, como medidas de tensão superficial e atividade emulsificante.

5.3.2 Densidade óptica

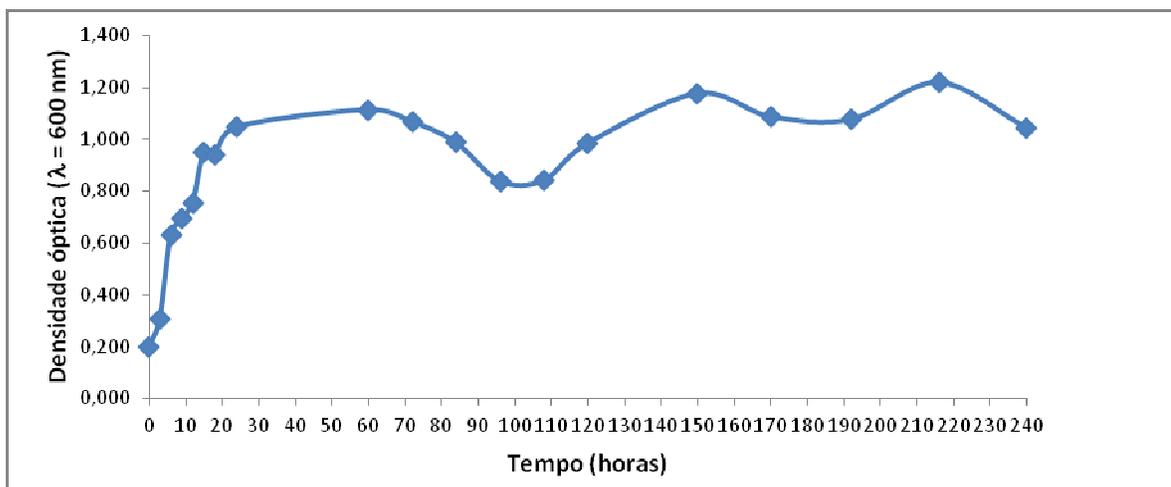


Figura 5.3: Variação da DO ($\lambda = 600\text{nm}$) durante o crescimento da *Gordonia amicalis* no meio GYP, por tempo de cultivo.

Além do número de UFC, o crescimento microbiano também pode ser medido pelo aumento da densidade óptica, através de medidas de absorbância a 600nm (Figura 5.3). Os dados mostrados corroboram com as medidas de UFC, apresentando uma fase de crescimento exponencial já a partir do inóculo. A fase estacionária iniciou-se após 24 horas.

Os valores de DO nos tempos 96 e 108 horas, apresentaram valores abaixo da média da fase estacionária (Tabela 8.2). Calculando-se o desvio padrão, somente os dados do tempo de 108 horas permanecem fora da média. Por ser um método indireto, as medidas de DO podem não corresponder diretamente às fases do crescimento bacteriano, visto que células mortas também aumentam o valor da DO.

Comparando-se as figuras 5.2 e 5.3, pode-se perceber uma diferença entre o tempo da fase exponencial, apresentando, no entanto, similaridade nas curvas de crescimento obtidas. Todos os métodos de estimativas de células viáveis podem apresentar erros, portanto, a utilização de mais de um método confere confiabilidade aos resultados (BARBOSA *et al*, 1994).

5.3.3 pH

O pH apresentou um aumento rápido durante a fase exponencial, e manteve-se constante na fase estacionária, com queda a partir do oitavo dia (Figura 5.4, Tabela 8.3). Matsuura (2004), em um trabalho com a mesma linhagem utilizada neste estudo, observou que, apesar de ocorrer o crescimento da linhagem, quantificado por aumento da DO do meio de cultivo, em pHs iniciais de 7 a 9, sua capacidade de redução da tensão superficial ocorria somente em pHs 7 e 8. Como o aumento do pH acompanha o crescimento do micro-organismo e a redução da tensão, pode-se sugerir que esteja relacionado à produção do CAS.

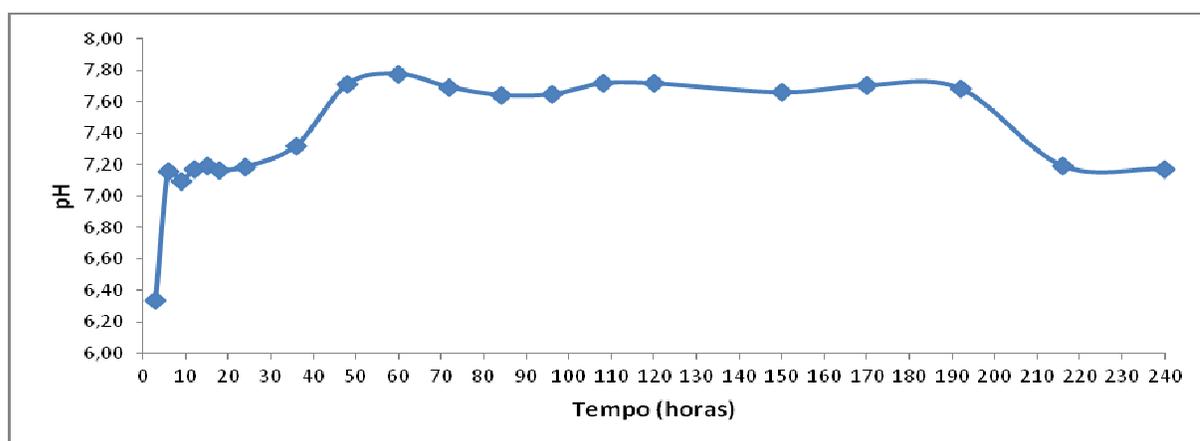


Figura 5.4: Variação do pH durante o crescimento da *Gordonia amicalis* no meio GYP, por tempo de cultivo.

5.3.4 Tensão Superficial

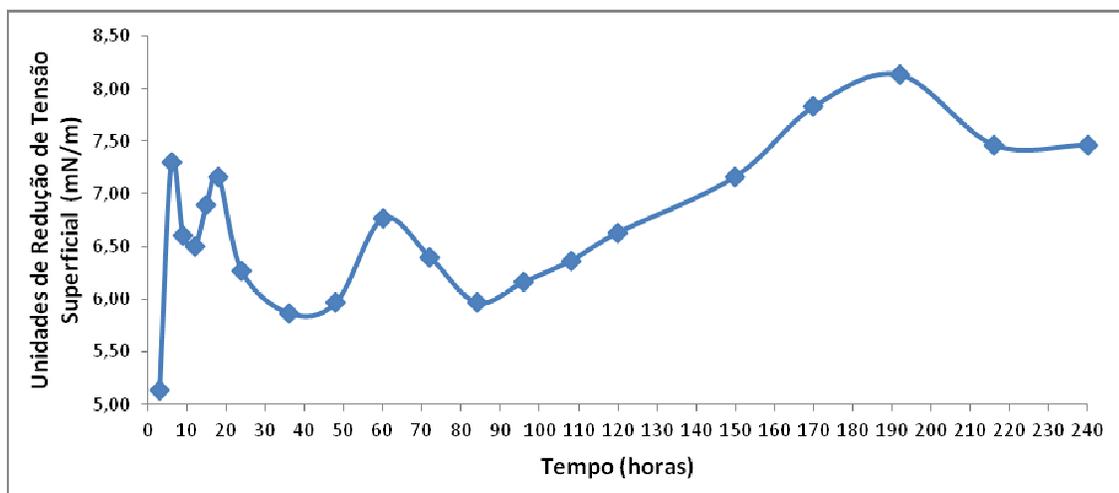


Figura 5.5: Variação das Unidades de Redução de Tensão Superficial durante o crescimento de *Gordonia amicalis* em meio GYP por tempo de cultivo.

No meio sintético GYP, a cepa de *Gordonia amicalis* não foi capaz de diminuir consideravelmente a tensão superficial (Figura 5.5 e tabela 8.4). Ocorreu uma diminuição inicial concomitante à fase exponencial, ocorrendo o aumento de 1 mN/m de redução de tensão superficial durante a fase estacionária. Os dados podem indicar que o surfactante microbiano produzido é um metabólito primário, porém são necessários mais experimentos para afirmar-se. A variação na tensão superficial do meio também pode estar relacionada à interação direta do biosurfactante com o substrato, conforme sugerido por Shavandi (2011) e apontado por alguns estudos (ABU-RUWAIDA *et al*, 1991; e PIETRO *et al*, 2008). Linhagens de *Gordonia* sp, quando cultivadas em meio contendo compostos hidrossolúveis apresentaram uma redução de tensão superficial menor do que em meios contendo substratos hidrofóbicos (FRANZETTI, 2007).

No trabalho de Matsuura (2004), o meio contendo a mesma linhagem apresentou sete unidades de redução de tensão em pH 7 e 8, sendo que esta redução ocorreu à

partir de 36 horas. Essa diferença com esse trabalho pode estar relacionada a diferenças no meio de cultivo e na fonte de carbono, no qual foi utilizado um meio básico de sais minerais, com óleo diesel como fonte.

5.4 Caracterização química do CAS

5.4.1 Análise do Extrato Bruto por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Após extração com Sulfato de Amônio, foi obtido um EBL de 0,5 g/L. Tanto a purificação como parte da caracterização química foram feitas por CCD. A caracterização química por CCD mostrou uma banda com Rf de 0.8, corada tanto por ácido sulfúrico quanto por ninidrina (figura 5.6). O ácido sulfúrico liga-se a açúcares, enquanto a ninidrina liga-se a aminoácidos.

Na literatura, há relatos de CASs que possuem tanto açúcares quanto aminoácidos em sua composição. O fungo *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 produz um bioemulsificante composto por 75% de lipídeos, 20% de açúcares e 5% de proteínas, quando cultivado em meio contendo hexano como substrato (ZINJARDE *et al*, 1996). Moormann (1997) e colaboradores relatam um lipopetídeo glicosilado, a gordonina, incorporado à parede celular de uma variante de *Gordona hydrophobica*, que também atua como um CAS extracelular quando a linhagem é crescida em substratos hidrofóbicos. Nesse estudo de Moormann (1997), quando corado com ninidrina, não ocorreu revelação de bandas, apesar de ter dado positivo quando corado com orcinol, o que seria um indicativo de que a molécula não possuía grupos amino livres. No estudo de Kushida (2000), o CAS produzido por *Gordonia amicalis*, apresentou a presença de aminoácidos quando revelado em placa de CCD com ninidrina, mas não de açúcares,

enquanto no estudo de Matsuura (2004), a mesma linhagem apresentou presença de açúcares. As diferenças podem estar relacionadas às condições de cultivo, sendo que diferentes fontes nutricionais podem influenciar o CAS produzido (GIHRIBI, ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011).

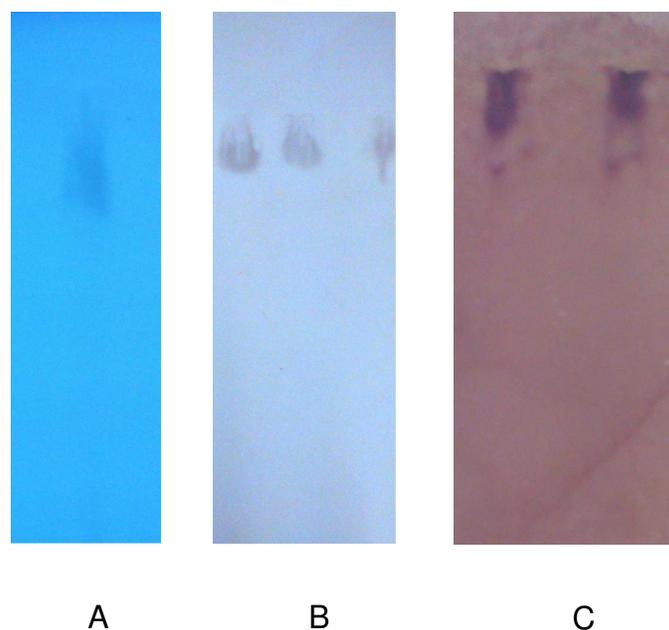


Figura 5.6. Revelação placa de CCD em: a) luz UV; b) ácido sulfúrico 6N; c) ninidrina 0,02%.

5.4.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformado de Fourier (IR-TF)

A análise de FT-IR (Figura 5.7) apresentou um estiramento em 3420 cm^{-1} , que pode ser de agrupamento OH, indicativo de grupos fenóis. O estiramento em 1648 pode ser um alceno, enquanto o estiramento 1242 é um indicativo de grupos C-O, provavelmente um éster ou um éter.

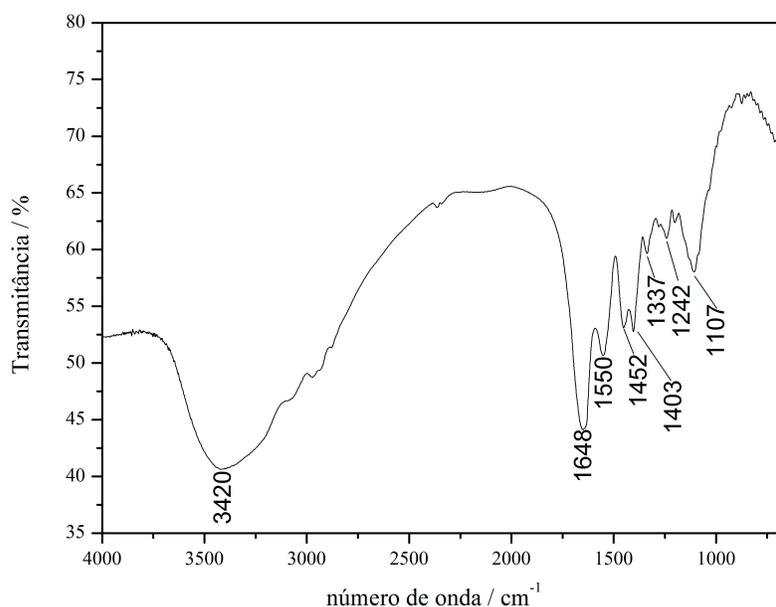


Figura 5.7. Espectroscopia IR-TF do CAS produzido por *Gordonia amicalis*.

Somente com a espectrometria por infravermelho utilizada sem complementação não é possível à definição de estrutura molecular, mas é importante para determinação de grupos funcionais de maior predominância.

5.5 Propriedades do CAS

5.5.1 Atividade emulsificante

A emulsão depende em partes da estrutura do surfactante, dependendo do balanço hidrofílico-lipofílico (HBL), ou seja, a proporção entre grupos lipofílicos e hidrofílicos. Moléculas lipofílicas têm tendência a formarem emulsões do tipo A/O, e moléculas hidrofílicas têm a capacidade de formarem emulsões do tipo O/A (DESAI, BANAT, 1997). Entretanto, a capacidade de formar emulsões, assim como a estabilidade da emulsão, em diferentes condições, não depende unicamente do emulsificante utilizado, mas também do substrato empregado.

5.5.1.1 Emulsão do tipo A/O

A figura 5.8 trás a imagem de duas emulsões formadas pelo CAS. As emulsões formadas em geral eram semelhantes. O tamanho da emulsão formada é apresentado na figura 5.9. Observando a figura, é perceptível que a emulsão se formou principalmente em substratos hidrofóbicos, sendo que substratos polares não formaram emulsão. A tabela 5.3 apresenta a AE_{24} do EBLC (Extrato Bruto Livre de Células) em cada substrato. Os resultados apresentados mostram que houve uma atividade emulsificante acima de 50% em óleo de fritura, hexadecano, tolueno, tetradecano, tridecano, pristano e hexadecano. Para avaliar se o extrato bruto teve influência na emulsificação do óleo de fritura, foi testada a emulsificação A/O somente com o meio de cultura, sem o surfactante produzido. Os resultados foram similares, portanto, o óleo de

fritura não foi emulsificado pelo surfactante microbiano. A figura 5.8 apresenta a emulsão formada em tolueno.



Figura 5.8- Emulsão do tipo A/O apresentada pelo EBLC após cultivo de 7 dias, tendo tolueno como substrato, onde A contém o EBLC, e B é o controle negativo com o meio de cultura GYP autoclavado.

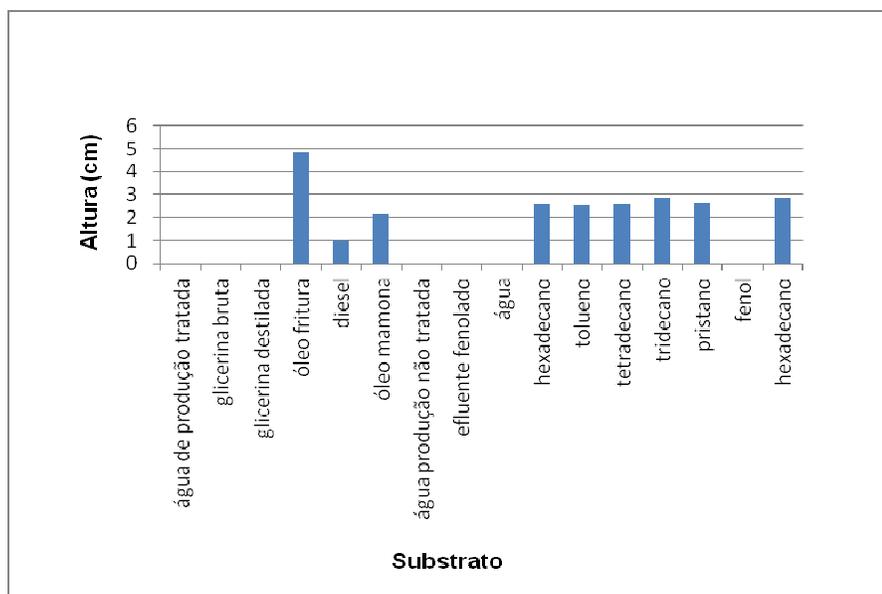


Figura 5.9. Emulsão do tipo A/O apresentado pelo EBLC isolado por precipitação com sulfato de amônio após 7 dias em diferentes substratos.

Tabela 5.3. AE₂₄ do tipo A/O do extrato bruto livre de células em diferentes substratos.

Substrato	Atividade Emulsificante (%)
água de produção tratada	0,00
glicerina bruta	0,00
glicerina destilada	0,00
óleo fritura	85,09
Diesel	20,00
óleo mamona	43,88
água produção não tratada	0,00
efluente fenolado	0,00
Água	0,00
hexadecano	50,00
tolueno	51,00
tetradecano	50,00
tridecano	54,81
pristano	50,96
Fenol	0,00
hexadecano	54,81

5.5.1.2 Emulsão do tipo O/A

Os resultados das medidas de emulsão do tipo O/A são apresentados na tabela 5.4.

Tabela 5.4. Atividade Emulsificante do tipo O/A do extrato bruto livre de células em diferentes substratos.

Substrato	Emulsão ($\lambda = 610$ nm)	Atividade Emulsificante
óleo fritura	1,4	Alta
Diesel	0,7	Moderada
óleo mamona	1,2	Alta
Hexadecano	0,1	Baixa
Tolueno	0,6	Baixa
Tetradecano	0,0	Não tem
Tridecano	0,1	Baixa
Pristano	0,2	Baixa
Hexadecano	0,0	Não tem
água de produção tratada	-0,2	Não tem
água de produção não tratada	0,6	Baixa
glicerina bruta	-0,1	Não tem
glicerina destilada	-0,1	Não tem
efluente fenolado	0,1	Baixa
Fenol	1,2	Moderada

Com os substratos utilizados, o EBLC apresentou emulsão do tipo O/A maior em óleo de fritura e óleo de mamona. Como o óleo de fritura apresenta a mesma

propriedade sem o biossurfactante considerou-se somente alta a emulsão do tipo O/A em óleo de mamona.

Comparando-se os dois tipos de emulsões formadas, percebe-se uma predominância de emulsões do tipo A/O na maior parte dos substratos (com exceção de óleo de mamona), o que caracteriza o CAS como uma molécula lipofílica.

5.5.1.3 Estabilidade da emulsão a temperatura, pH, salinidade, tempo de cultivo e duração da emulsão

O EBLC apresentou estabilidade em todas as faixas de temperatura testadas, tanto no caldo extraído no 7º dia quanto no extraído no 14º dia (Figura 5.10).

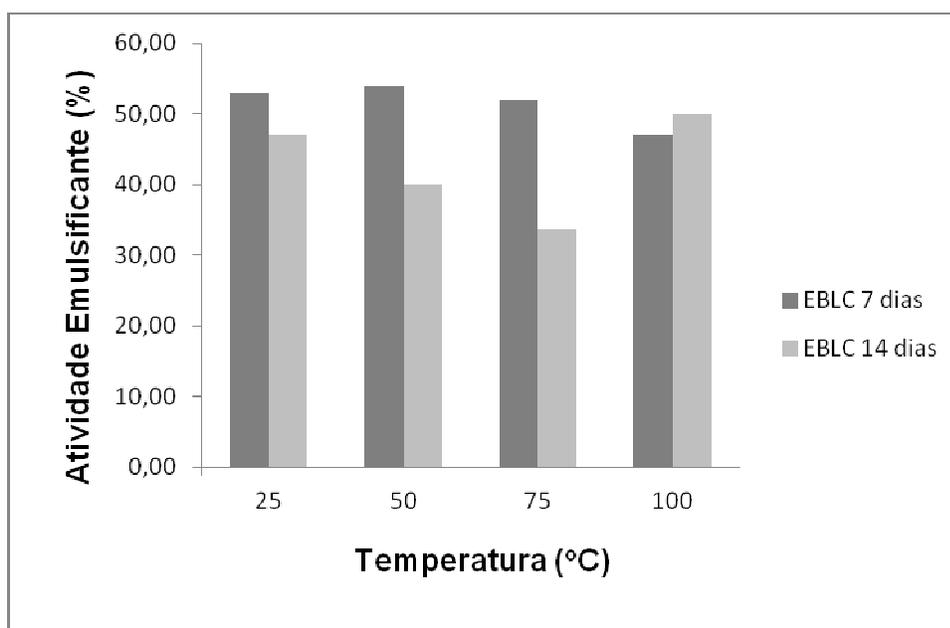


Figura 5.10. AE_{24} dos EBLCs extraídos em 7 e 14 dias, após 1 hora em diferentes temperaturas.

Quanto à salinidade, o EBLC de 7 dias apresentou estabilidade nas 3 concentrações de NaCl (5%, 10% e 15%), enquanto o EBLC de 14 dias não formou

emulsões nos tratamentos com 5% e 10% de NaCl, e teve uma atividade emulsificante menor a 15% de NaCl (Figura 5.11). No estudo de Matsuura (2004), foi observada uma queda na atividade emulsificante somente com uma salinidade de 30%. Abu-Ruwaida (1991) sugere que a atividade emulsificante é dependente mais da interação do CAS com o substrato do que da tensão superficial do líquido. A estabilidade da emulsão formada em uma ampla faixa de salinidade também foi observada com *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106, com variação de 2-20% de NaCl (TECHAOEI *et al*, 2011).

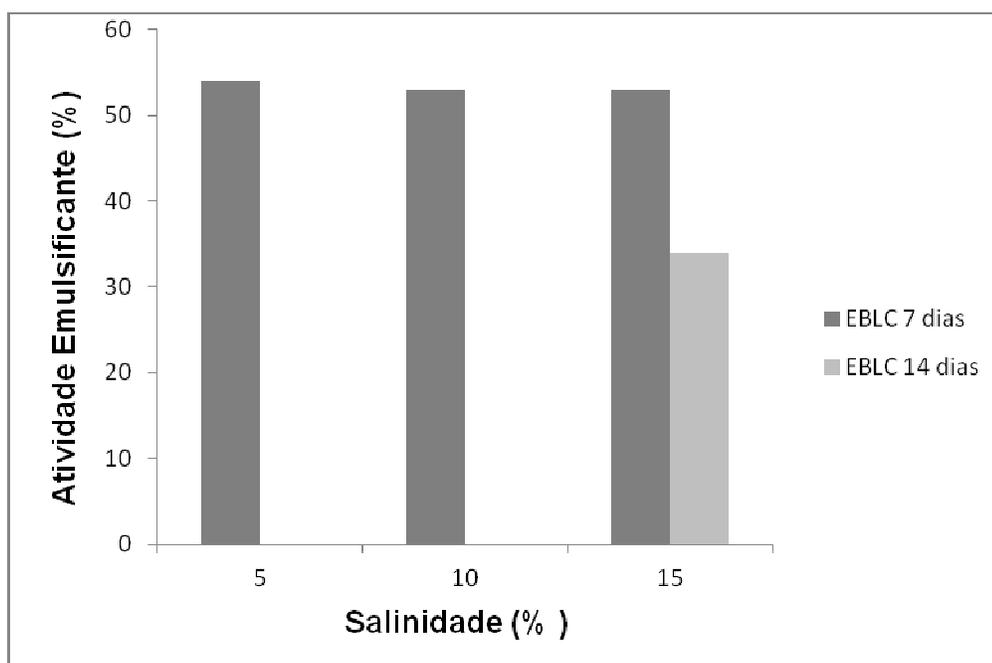


Figura 5.11. AE_{24} dos EBLCs extraído em 7 e 14 dias em diferentes salinidades(em % de NaCl).

Por fim, o EBLC de 7 dias apresentou estabilidade na faixa de pH de 2 a 10, enquanto o EBLC de 14 dias apresentou estabilidade somente em pH básico e alcalino, não formando emulsão em pH ácido (gráfico 4.8). A emulsão formada pelo EBLC de 7 dias permaneceu estável por mais de um mês, enquanto a emulsão formada pelo EBLC de 14 dias começou a desestabilizar após uma semana de sua formação. Kushida (2000) observou que em pHs ácidos (2,0 e 2,8) a atividade de emulsificação do biossurfactante do EBLC foi baixa, normalizando acima de pH 6,5. Quando testado com

biossurfactante de *Bacillus* sp., este não apresentou atividade de emulsificação em pHs ácidos, o que pode ter ocorrido devido a precipitação do biossurfactante, ou mesmo a hidrólise da molécula (KUSHIDA, 2000).

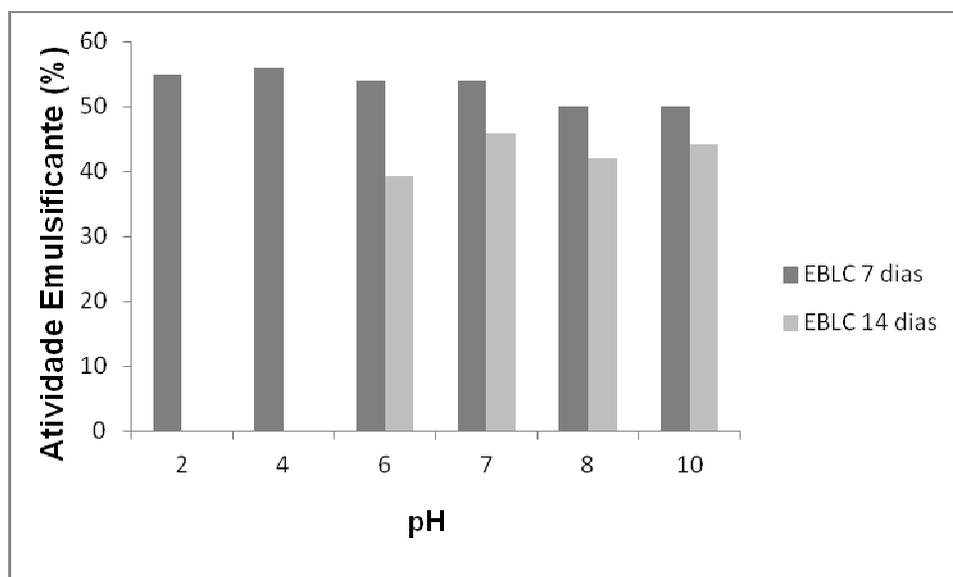


Figura 5.12. AE_{24} dos EBLCs extraídos em 7 e 14 dias, em diferentes pHs.

Os dados observados mostram que o CAS presente no EBLC, após 14 dias de cultivo, diminui ou mesmo anula sua AE_{24} , dependendo da condição a qual é submetido. Pode-se sugerir que essa queda na eficiência é devido a degradação parcial do biossurfactante.

5.5.2 Ângulo de Contato

Os dados obtidos nas análises comparativas de gotas formadas por água e gotas formadas pelo CAS disperso em água são apresentados na tabela 5.5, nas figuras 5.13,

5.14, 5.15 e 5.16. Considerando-se a média das amostragens, o CAS promoveu mudanças significativas no ângulo de contato da gota com a mesa metálica do apoio e com o Teflon. Na lâmina de vidro, apesar de ter ângulos de contato menores que a gota contendo somente água, a diferença observada está dentro do desvio padrão.

Tabela 5.5. Ângulo de contato da água e do CAS disperso em água em teflon, lâmina de vidro e no material metálico.

Superfície	CAS disperso em água	Água
Mesa metálica	61,65 ± 1,78	71,45 ± 3,93
Lâmina vidro	37,09 ± 1,12	41,80 ± 3,97
Teflon	78,15 ± 1,67	111,4 ± 10,77

As imagens da interação das gotas com as diferentes superfícies (Figura 5.13) mostram que no material metálico e no teflon, a adição do CAS à água aumentou o contato da gota com a superfície, o que mostra visualmente um aumento da sua molhabilidade. No teflon, que é um material hidrofóbico, de acordo com Verplanck (2007) e colaboradores, e anti-aderente, a diferença do ângulo de contato foi ainda mais pronunciada. A hidrofobicidade de um material é relacionada à sua molhabilidade, sendo que quanto maior o ângulo de contato, maior sua hidrofobicidade e menor sua molhabilidade (VERPLANCK *et al*, 2007). Quando se altera o ângulo de contato, altera-se portanto, a molhabilidade de um material.

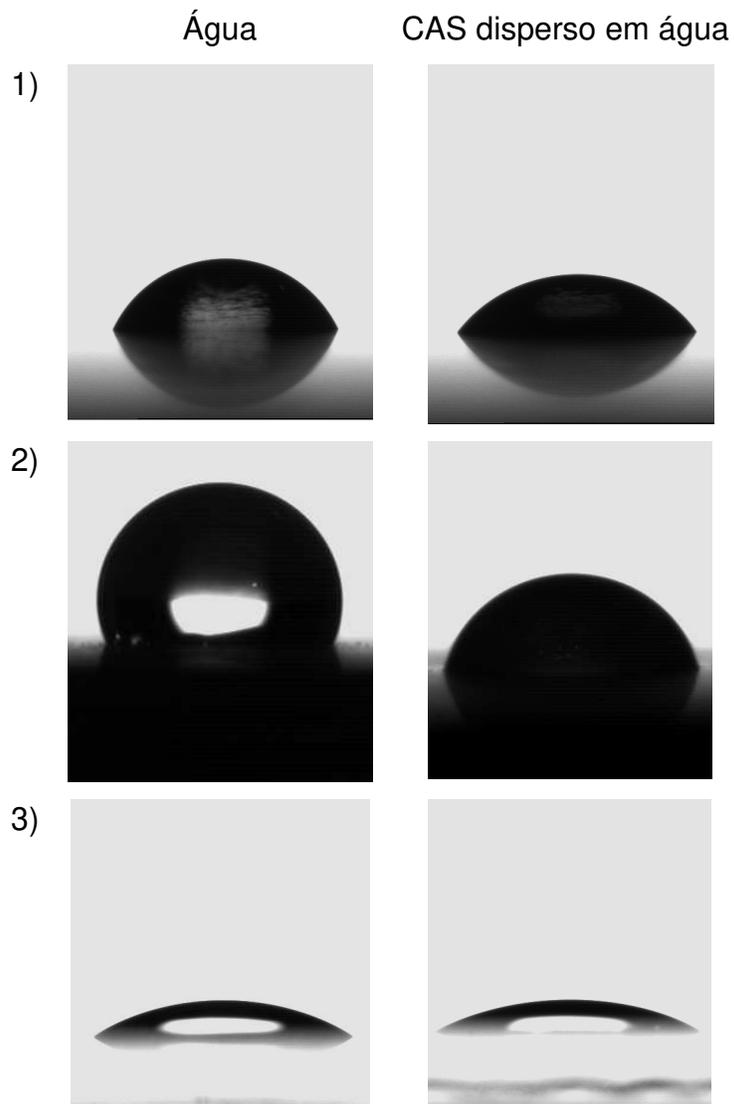


Figura. 5.13. Comportamento da gota de água e de água com o CAS em: 1) material metálico; 2) teflon; 3) vidro.

As figuras 5.14, 5.15 e 5.16 apresentam a variação do ângulo de contato ao longo do tempo. Pode-se observar que tanto a água quanto a água com o CAS apresentam uma ligeira queda no valor do ângulo de contato, provavelmente devido a alterações na adsorção da água ao material, o que diminui sua hidrofobicidade. Porém, com o CAS, essas modificações foram mais pronunciadas. O CAS, portanto, quando disperso em água, modifica seu ângulo de contato. Modificações na cargas elétricas e hidrofobicidade em superfícies podem estar ligadas à adsorção e dessorção de micro-

organismo (DESAI & BANAT, 1997; MEYLHEU *et al*, 2001). Em um trabalho com borracha de silicone, um biossurfactante produzido por *Lactococcus lactis* atuou diminuindo o ângulo de contato da borracha de silicone de 109° para 48°, o que diminuiu a aderência de micro-organismos patogênicos (RODRIGUES *et al*, 2004). Resultado semelhante ocorreu em um estudo com biossurfactante de *Pseudomonas fluorescens* que, quando aplicado em superfícies de teflon e de aço inoxidável, diminuiu a colonização dos materiais pela linhagem de *Listeria monocytogenes* LO28 (MEYLHEU *et al*, 2001).

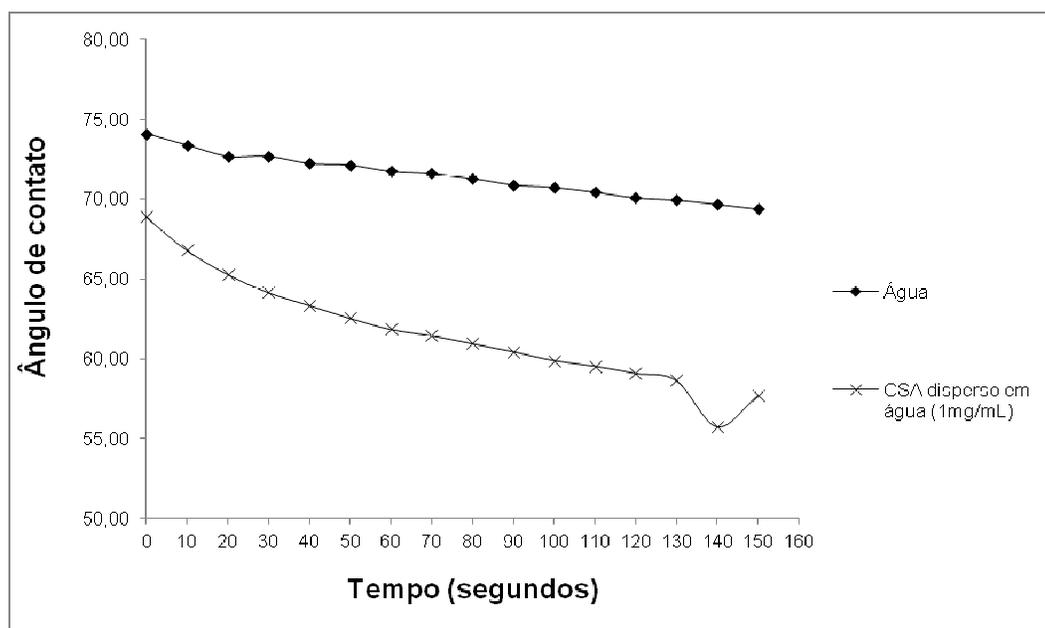


Figura 5.14. Ângulo de contato da água e da água com CAS em material metálico, com medições realizadas a cada 10 segundos.

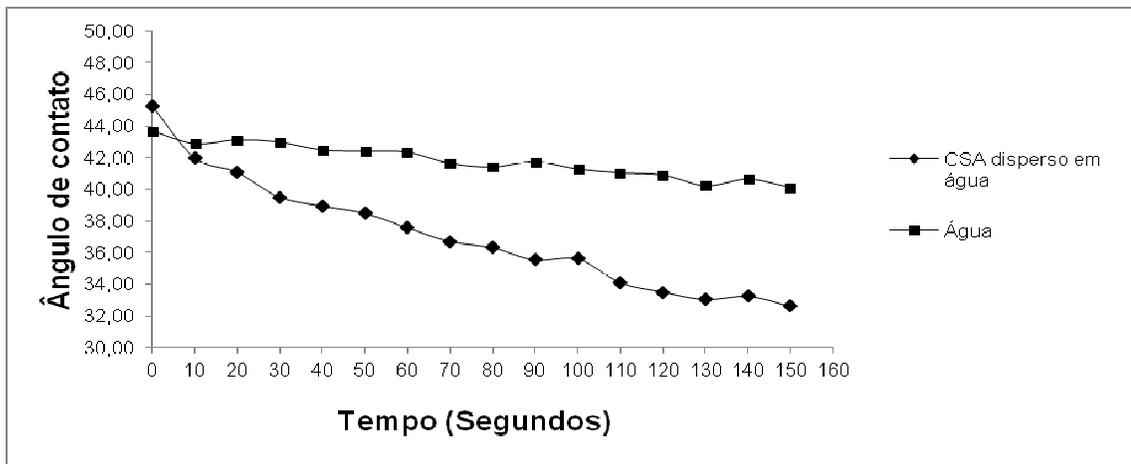


Figura 5.15. Ângulo de contato da água e do CAS disperso em água em superfície de vidro, com medições a cada 10 segundos.

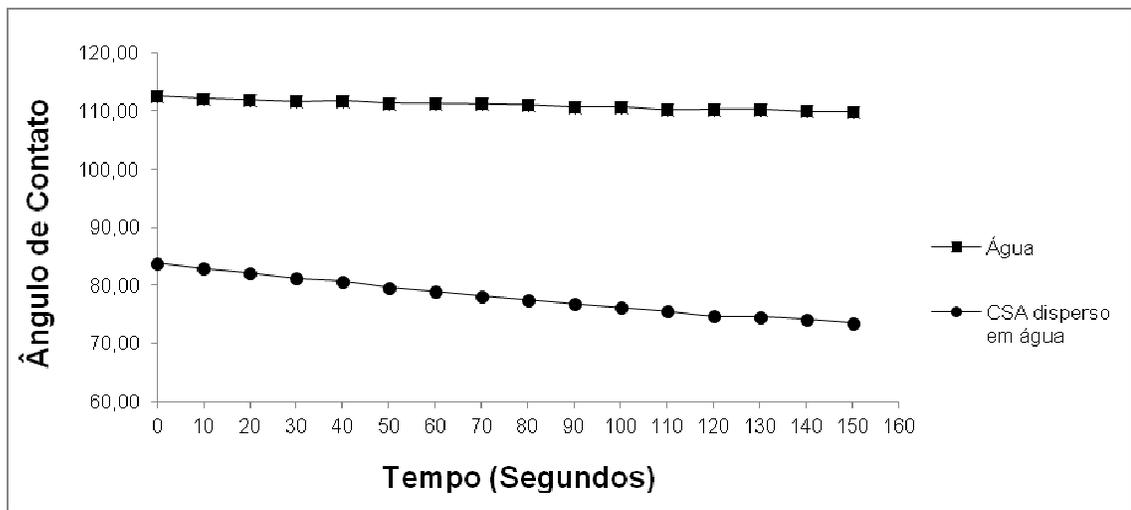


Figura 5.16. Ângulo de contato de água e CAS disperso em água em superfície de teflon, com medições a cada 10 segundos.

5.5.3 Potencial Zeta

Pela análise do potencial Zeta (Figura 5.17), é possível inferir que o CAS produzido por *Gordonia amicalis* possui cargas negativas, o que corrobora com estudos que apontam que os surfactantes microbianos são aniônicos ou neutros (BOGNOLO, 1999). Até o momento, não a descrito em literatura surfactantes microbianos catiônicos, apesar da presença de grupos aminos na molécula poder conferir um pqueno grau catiônico. O composto apresenta uma carga de -31mV, com um desvio padrão de $\pm 3,58$ mV, o que confirma seu caráter aniônico.

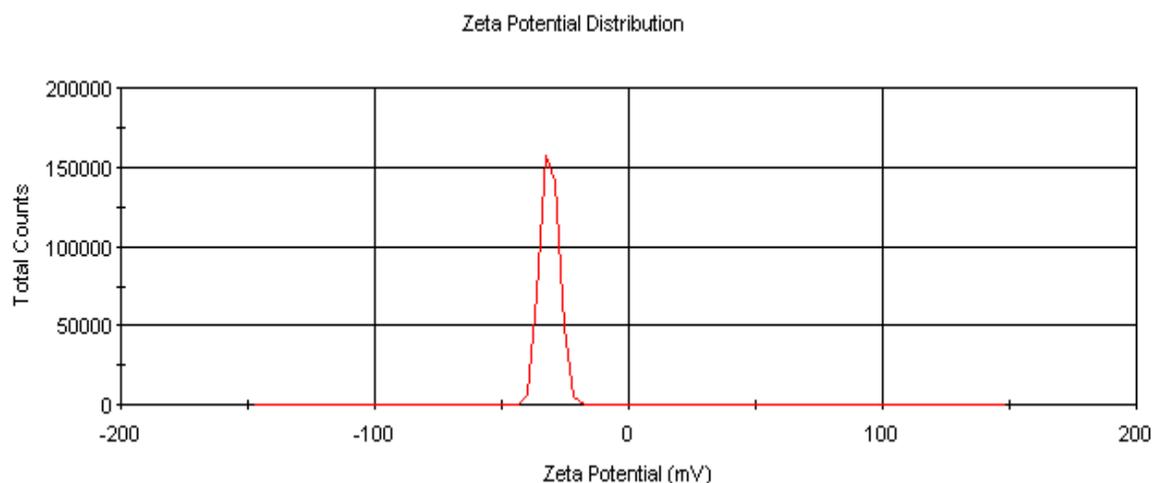


Figura 5.17. Potencial Zeta do CAS.

6 CONCLUSÕES

- A análise dos dados permitiu classificar o isolado previamente identificado como *P. citreus* como *Gordonia amicalis*. Esse estudo torna-se, portanto, uma ferramenta importante para estudos futuros sobre a produção de CASs pela linhagem.
- O micro-organismo estudado mostrou-se capaz de produzir um CAS quando cultivado em meio GYP. Sua cinética de crescimento mostrou uma redução de tensão superficial maior durante a fase exponencial, o que pode indicar uma produção do composto como metabólito primário.
- Foi possível a recuperação de um CAS pelo método de precipitação com sulfato de amônio.
- A molécula isolada possui atividade emulsificante do tipo O/A e A/O em diversos substratos hidrofóbicos. Apresentou estabilidade a temperatura, pH e salinidade extremos, perdendo essa estabilidade quando recuperada após 14 dias de cultivo. Um dos motivos pode ser a biodegradação e consumo da molécula presente no meio.
- Sua caracterização mostrou a presença de açúcares e aminoácidos e a presença de grupo alcenos e ésteres ou éteres.
- O CAS produzido por *Gordonia amicalis* é uma molécula aniônica, e tem a propriedade de alterar interação entre água e superfícies.
- O CAS isolado é uma molécula que apresenta características que podem ser utilizadas, após estudos adicionais, para processos de biorremediação e como agente emulsificante em processos industriais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAD-ANDALOUSSI, S., M. WARZYWODA, AND F. MONOT. Microbial desulfurization of diesel oils by selected bacterial strains. **Oil and Gas Science Technology**. v.58, p. 505-513, 2003.

ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of *biosurfactant*-producing bacteria, product characterization and Evaluation. **Acta Biotechnologica**. v.11, p. 315–324, 1991.

ADEBUSOYE, S.A.; AMUND, O.O.; ILORI, M.O.; DOMEIH, D.O.; OKPUZOR, J. Growth and biosurfactant synthesis by Nigerian hydrocarbon-degrading estuarine bacteria. **International Journal of Tropical Biology**. v. 56, n. 4, p.1603-1611, 2008.

ALEXANDER, M. 1999. **Biodegradation and Bioremediation**. 2 ed. San Diego, Academic Press. 453 p.

AL-ARAJI, L.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Microbial Surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. v.15 n. 3, p.99-105, 2007.

ANANDARAJ, B.; THIBAKARAN, P. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil. **Journal of Bioscience Technology**, v.1, n.3, p.120-126, 2010.

ARENSKÖTTER, M.; BRÖKER, D.; STEINBÜCHEL, A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. **Applied Environmental Microbiology**. v.70, p.3195-3204, 2004.

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 Community**. v.31, p. 488-494, 1968.

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

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

BANAT, I.M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M.G., FRACCHIA, L., SMYTH, T.J., MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 87, p. 427–444, 2010.

BARBOSA, H.R.; RODRIGUES, M.F.A.; CAMPOS, C.C.; CHAVES, M.E.; NUNES, I.; JULIANO, Y.; NOVO, N.F. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. **Journal of Microbiological Methods**. v. 22, p. 39-50, 1995.

BAYOUMI, R.A., HAROUN, B.M., GHAZAL, E.A. AND MAHER, Y.A. Structural Analysis and Characteristics of Biosurfactants Produced by Some Crude Oil Utilizing Bacterial Strains. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 4, n. 8, p. 3484-3498, 2010.

BERNA, J.L.; CASSANT, G.; HAGER, C.D.; REHMAN, N.; LÓPEZ, I.; SCHOWANEK, D.; STEBER, J.; TAEGER, K.; WIND, T. Anaerobic biodegradation of surfactants- scientific review. **Tenside Surfactants Detergent**. v. 44, p. 312–347, 2007.

BOGNOLO, G. Biosurfactants and emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and surfaces**. v. 152, p. 41-52, 1999.

BORGNE, S.L.; PANIAGUA, D.; DUHALT, R.V. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. v. 15, p. 74–92, 2008.

BORIS, S.; BARBÉS, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes and Infection**. v. 2, n. 5, p. 543–546, 2000.

BROWN, L.R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**. v. 13, p. 316–320, 2010.

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

CHANTHAMALEE, J.; LUEPROMCHAI, E. Isolation and application of *Gordonia* JC11 for removal of boat lubricants. **Journal of Genetic Applied Microbiology**. v. 58, p. 19-31, 2012.

CHAMANROKH, P.; ASSADI, M.M.; NOOHI, A.; YAHYAI, S. Emulsan Analysis Produced by Locally Isolated Bacteria and *Acinetobacter Calcoaceticus* RAG-1, **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**. v. 5, n. 2, p. 101-108, 2008.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DU, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 42, p. 408-412, 1981.

COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E.; GERSON, D.F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 37, n. 1, p. 4–10, 1979.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K.; SUMALATHA, S. Sophorolipids production by *Candida bombicola* using dairy industry wastewater. **Clean Technologies & Environmental Policy**. v. 13, n. 3, p. 174-176, 2011.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiological Molecular Biology Reviews**. v. 61, p. 47-64, 1997.

DE LOS REYES, M. F., DE LOS REYES, F.L.; HERNANDEZ, M.; RASKIN, D.L. Quantification of *Gordonia amarae* strains in foaming activated sludge and anaerobic digester systems with oligonucleotide hybridization probes. **Applied Environmental Microbiology**. v. 64, p. 2503-2512, 1998.

DHAIL, S.; JASUJA, N.D. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. **African Journal of Environmental Science and Technology**. v. 6, n. 6, p. 263-266, 2012.

DITTMER, J.C.; LESTER, R.L. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin layer chromatograms. **Journal of Lipid Research**. v. 5, n. 1, p. 126-127, 1964.

DOROBANTU, L.S.; YEUNG, A.K.C; FOGHT, J.M.; GRAY, M.R. Stabilization of Oil-Water Emulsions by Hydrophobic Bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. v. 70, n. 10, p. 6333–6336, 2004.

DRZYZGA, O. The strengths and weaknesses of *Gordonia*: A review of an emerging genus with increasing biotechnological potential. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 38, n. 4, p. 300-316, 2012.

EDWARDS D.; LUTHY, R.; LIU, Z. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar non-ionic surfactant solutions. **Environmental Science Technology**. v. 25, p. 127–133, 1991.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names Standing in Nomenclature – Genus *Gordonia***. Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/g/gordonia.html> >. Acesso em 13 nov. 2012.

FARIA, A.F. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual**. 149p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/Brasil, 2010.

FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; ALLEGRONE, G.; MARTINOTTI, M.G. **A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers**. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. v. 2, Spain, Mendez Vilas A Ed., p. 827-837, 2010.

FRANZETTI, A. **Surface Active Compounds by *Gordonia* and their applications in environmental remediation**. 120p. Tese de Doutorado (Dottorato di Ricerca in Scienze Ambientali – XX ciclo)Università Degli Studi di Milano, Milão, 2007.

FREIRE, D.M.G.; ARAÚJO, L.V.A.; KRONENBERGER, F.A.; NITSCHKE, M. **Biosurfactants as Emerging Additives in Food Processing** In: *Innovation in Food Engineering – New Techniques and Products*. CRC Press, p. 685-705, 2009

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polimers**. v. 78, p. 549-556, 2009.

GANDHIMATHI, R.; SEGHAL KIRAN, G.; HEMA, T.A.; SELVIN, J.; RAJEETHA RAVIJI, T.; SHANMUGHAPRIYA, S. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MSA10. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 32, p. 825–835, 2009.

GIL, N.F.; MARTINEZ, R.C.R.; GOMES, B.C.; NOMIZO, A.; MARTINIS, E.C.P. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 6-14, 2010.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. **Biotechnology Research International**. v.2011, p. 1-6, 2011.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, **Applied Environmental Microbiology**. v. 48, p. 301–305, 1984.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KIIPPELI, O.; FIEEHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors, **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 24, p. 443-448, 1986.

HABA,E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 379–387, 2000.

HARVEY, S.; ELASHVILI, I.; VALDES, J.J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, A.M. Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant. **Nature Biotechnology**. v.8, p. 228 – 230, 1990

HIRATA, Y.; RYUA, M.; ODAA, Y.; IGARASHIA, K.; NAGATSUKAA, A.; FURUTA, T.; SUGIURA, M. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 108, n. 2, p. 142-146, 2009.

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

IVSHINA, I.B.; KUYUKINA, M.S.; PHILP, J.C.; CHRISTOFI, N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 14, p. 711-717.

JACOBUCCI, D. F. C.; VASCONCELOS, C.K.; MATSUURA, A.B.; FALCONI, F.A.; DURRANT, L.R. Degradation of diesel oil by biosurfactant-producing bacterial strains. **Contaminated Soil Sediment and Water**. v. 8, n. 1, p. 31-34, 2001.

JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; REZANKA, T.; KRASOWSKA, A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 15, p. 6118-6123, 2010.

JARVIS, F. G., AND M. J. JOHNSON. 1949. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of American Chemistry Society**. v. 71, p. 4124–4126.

KÄPPELI, O.; FINNERTY, W.R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**. v. 140, n. 2, p. 707–712, 1979.

KEBBOUCHE-GANA, S.; GANA, M.L.; KHEMILI, S.; FAZOUANE-NAIMI, F.; BOUANANE, N.A.; PENNINGCKX, M.; HACENE, H. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 36, n. 5, p. 727-738, 2009.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis* sp. B4. **Desalination**. v. 285, p. 198–204, 2012.

KIM, P.; OH, D.; KIM, S.; KIM, J. Relationship between emulsifying activity and carbohydrate backbone structure of emulsan from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Biotechnology Letters**. v. 19, n. 5, p. 457–459, 1997.

KIM, S.H.; LIM, E.J.; LEE, S.O.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnological Applied Biochemistry**. v. 31, p. 249-253, 2000.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. v. 16, p. 111–120, 1980.

KIRAN, G.S.; THOMAS, T.A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A.P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource technology**. v. 101, p. 2389-2396.

KLOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I.E.; MEDRZYCKA, K.; KARPENK, E. **Biosurfactants – Biodegradation, toxicity, efficiency in comparison with synthetic surfactants**. 2011. Disponível em: < <http://www.wis.pk.edu.pl/media/file/konferencje/Klosowska-Chomiczewska.pdf> > Acesso em: 12 nov. 2012

KOCH, A.L. 1981. **Growth measurement**. In: **Manual of Methods for General Bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington. p. 179-207. *apud* BARBOSA, H.R.; RODRIGUES, M.F.A.; CAMPOS, C.C.; CHAVES, M.E.; NUNES, I.; JULIANO, Y.; NOVO, N.F. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. **Journal of Microbiological Methods**. v. 22, p. 39-50, 1995.

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

KOSARIC, N. Biosurfactants for Soil Bioremediation, **Food Technology Biotechnology**. v. 39, n. 4, p. 295–304, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**. v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

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**. v. 46, n. 2, p. 149-156, 2001.

KUSHIDA, M.M. **Caracterização parcial e propriedades de biossurfactantes bacterianos**. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

LANG, S. Biological amphiphiles: microbial biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 7, p. 12-20, 2002.

LAZAR, I.; PETRISOR, I.G.; YEN, T.F. Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**. v. 25, p. 1353–1366, 2007.

LAVAL, F.; LANÉELLE, M.; DÉON, C.; MONSARRAT, B.; DAFFÉ, M. Accurate Molecular Mass Determination of Mycolic Acids by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**. v. 73, p. 4537-4544, 2001.

LIMA, T.M.S.; PROCÓPIO, L.C.; BRANDÃO, F.D.; CARVALHO, A.M.X.; TÓTOLA, M.R.; BORGES, A.C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**. v. 22, p. 585–592, 2011.

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. **Advances in Applied Microbiology**. v. 52, p. 101-116, 2003.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. **Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production**. *AMB Express*, p. 1-5, 2011. Disponível em: <<http://www.amb-express.com/content/1/1/5>> Acesso em: 15 out. 2012.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental and Toxicological Chemistry**. v. 22, p. 2280–2292, 2003.

MAKULA, R.A.; LOCKWOOD, P.J.; FINNERTY, W.R. Comparative Analysis of the Lipids of *Acinetobacter* Species Grown on Hexadecane. **Journal of Bacteriology**. v. 121, n. 1, p. 250-258, 1975.

MACDONALD, C.R.; COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E. Surface-Active Lipids from *Nocardia erythropolis* Grown on Hydrocarbons. **Applied Environmental Microbiology**. v. 41, n. 1, p. 117–123, 1981.

MATSUURA, A.B.J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas/Brasil, 2004.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C.J.; BELLON-FONTAINE, MN. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, n. 5, p. 822-832, 2001.

MOHEBALI, G.; BALL, A.; KAYTASH, A.; RASEKH, B. Stabilization of water/gas oil emulsions by desulfurizing cells of *Gordonia alkanivorans* RIPI90A . **Microbiology**. v. 153, n. 5, p. 1573-1581, 2007.

MOORMANN, M.; ZÄHRINGER, U.; MOLL, H.; KAUFMANN, R.; SCHIMID, R.; ALTENDORF, K. A New Glycosylated Lipopeptide Incorporated into the Cell Wall of a Smooth Variant of *Gordona hydrophobica*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 16, p. 10729-10738, 1997.

MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, Y.; IMANAKA, T. A New Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. **Journal of Bacteriology**. v. 175, n. 20, p. 6459-6466, 1993.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**. v. 133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN CN, MAHMOURIDES G, GIBBS BF. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 12, p. 199–210, 1989.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Recovery of Biosurfactants by Ultrafiltration. **Journal of Chemistry Technological Biotechnology**. v.41, p. 23-29, 1990.

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

NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 9, p. 3240-3244, 1995.

NEU, T.R. Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. **Microbiological Reviews**. v. 60, n. 1, p. 151–166, 1996.

NISHIUCHI, Y.; BABA, T.; HOTTA, H.H.; YANO, I. Mycolic acid analysis in *Nocardia* species: The mycolic acid compositions of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica*, and *N. nova*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 37, p. 111-122, 1999.

NISHIUCHI, Y.; BABA, T.; E YANO, I. Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 40, p. 1–9, 2000.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**. v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.

OKOLIEGBE, I.N.; AGARRY, O.O. Applications of microbial surfactant (a review) **Scholarly Journals of Biotechnology**. v. 1, n. 1, p. 15-23, 2012.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 12, p. 633-654, 2011.

PAGILLA, K. R., SOOD,A.; KIM, H. *Gordonia (Nocardia) amarae* foaming due to biosurfactant production. **Water Science and Technology**. v. 46, p. 519-524, 2002.

PANAGODA, G. J.; ELLEPOLA, A. N.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**. v. 44, p. 29-35, 2001.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M. E WALLACH, J. Recent Trends in the Biochemistry of Surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 553-563, 1999.

PERSSON,A.; ÖSTERBERG, E.; DOSTALEK, M. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 29, n. 1, p. 1-4, 1988.

PRIETO, L.M.; MICHELON, M.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**. v. 71, p. 1781–1785, 2008.

POST, F.J.; COLLINS, N.F. A preliminary investigation of the membrane lipid of *Halobacterium halobium* as a food additive. **Journal of Food Biochemistry**. v. 6, n. 1, p. 25-38, 1982.

RAMKRISHNA, S. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 34, n. 6, p. 714–724, 2008.

RAPP, P.; BOCK, H.; WRAY, V.; WAGNER, F. Formation, Isolation and Characterization of Trehalose Dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* Grown on *n*-Alkanes. **Microbiology**. v. 115, n. 2, p. 491-503, 1979.

- RODRIGUES, L.; VAN DER MEI, H.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. **Applied Microbiological Biotechnology**. v. 66, p. 306–311, 2004.
- ROSE, K.; STEINBÜCHEL, A. Biodegradation of natural rubber and related compounds: recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**. v. 71, p. 2803–2812, 2005.
- ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.E.; GUTNICK, D. L. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and Emulsifying Properties. **Applied Environmental Microbiology**. v. 37, p. 402-408, 1979.
- ROSENBERG, M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**. v. 22, p. 289-295, 1984.
- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 52, p. 154-162, 1999.
- RUST, D.; WILDES S. **SURFACTANTS A Market Opportunity Study Update. United Soybean Board**. 43 p. Disponível em < <http://soynewuses.org/wp-content/uploads/pdf/Surfactants%20MOS%20-%20Jan%202009.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2012.
- SAITOU, N., NEY, M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. v. 4 p. 406 425, 1987.
- SANDBACKA, M., CHRISTIANSON, I. E ISOMAA, B. The Acute Toxicity of Surfactants on Fish Cells, *Daphnia magna* and Fish-DA Comparative Study. **Toxicology in Vitro**. v. 14, p. 61-68, 2000.
- SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**. v. 2011, p. 1-14. Disponível em: <http://astonjournals.com/manuscripts/Vol2011/GEBJ-29_Vol2011.pdf> Acesso em: 05 nov. 2012.
- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, n. 5-6, p. 650-663, 2001.
- SINGH, V. Biosurfactant: Isolation, Production, Purification & Significance. **International Journal of Scientific and Research Publications**. v.2, n. 7, p. 1-4, 2012.

DA SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnological Advances**. v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.

SHAVANDI M, MOHEBALI G, HADDADI A, SHAKARAMI H, NUHI A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 82, n. 2, p. 477-82, 2011.

SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting Rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Technics**. v. 5, n. 4, p. 265-268, 1991.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**. v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 68, n. 6, p. 718-725, 2005

SOUZA, J. T.; BOER, M.; WAARD, P.; VAN BEEK, T.A.; Raaijmakers, J.M. Biochemical, Genetic, and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, n. 12, p. 7161–7172, 2003.

STOBDAN, T.; SINHA, A., SINGH, R.P.; ADHIKARI, D.K.; Degradation of pyridine and 4-methylpyridine by *Gordonia terre* IIPN1. **Biodegradation**. v. 19, p. 481-487.

SYLDATK C, HAUSMANN R. Microbial biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 112, p. 615–616, 2010.

SZE, A.; ERICKSON, D.; REN, L.; LI, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 261, n. 2, p. 402–410, 2003.

TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G.S. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology**. v. 18, p. 81-101, 2005.

TECHAOEI, S.; LUMYONG, S.; PRATHUMPAI, W.; SANTIARWARN, D.; LEELAPORN-PISID, P. Screening Characterization and Stability of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* SCM106 Isolated from Soil in Northern Thailand. **Asian Journal of Biological Sciences**. v. 4, n. 4, p. 340-351, 2011.

THAVASI, R.; SUBRAMANYAM NAMBARU, V.R.; JAYALAKSHMI S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I.M. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. **Indian Journal of Microbiology**. v. 51, n. 1, p. 30-36, 2011.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.J.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, n. 22, p. 4673-4680.

TUGRUL, T.; CANSUNAR, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 21, p. 851–853, 2005.

VAN BOGAERT, I.N.A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry** . v. 46, p. 821–833, 2011.

VATER, J., KABLITZ, B., WILDE, C., FRANKE, P., MEHTA, N. E CAMEOTRA, S. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactant in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C1 Isolated from Petroleum Sludge. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 6210-6219, 2002.

VENKATA RAMANA, K.; KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa*CFTR-6 under submerged conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 45, n. 4, p. 249–257, 1989.

VERPLANCK, N.; COFFINIER, Y.; THOMY, V.; BOUKHERROUB, R. Wettability Switching Techniques on Superhydrophobic Surfaces. **Nanoscale Research Letters**. v. 2, n. 12, p. 577-596, 2007.

VYAS, T.K.; DAVE, B.P. Production of biosurfactant by *Nocardia otitidiscaviarum* and its role in biodegradation of crude oil. **International Journal of Environmental Science Technology**. v. 8, n. 2, p. 425-432, 2011.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. **Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms**. In: Sen R (ed) *Biosurfactants: advances in experimental medicine and biology*, vol 672. New York, NY: Springer, 2008, p. 1–14.

WILLIAMS, K.. Biosurfactants for cosmetic application: Overcoming production challenges. **Basic Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 78-83, 2009.

XU, L.; GAO, Z.; LUO, M.; CHENG, Y.; JIN, J. Isolation and identification of a pyrene-degrading bacterial strain from contaminated soil. **Acta Microbiologica Sinica**. v. 51, p. 313-319, 2011.

WOLIN, E.A.; DYALL-SMITH, M. 2009 The Halohandbook – **Protocols for Haloarchaeal Genetics**, version 7.0, 144p. Disponível em: <<http://www.haloarchaea.com/resources/halohandbook/>>. Acesso em: 14 nov. 2012

YOUSSEF, N.H.; DUNACN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. **Journal of Microbiological Methods**. v. 56, p. 339–347, 2004.

ZÁRATE,G.; SANTOS, V.; NADER-MACIAS, M.E. Protective Effect of Vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289v against Urogenital Infection Produced by *Staphylococcus aureus* in a Mouse Animal Model. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, 6p, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868078/pdf/IDOG2007-48358.pdf>> Acesso em: 05 nov. 2012.

ZINJARDE, S.; CHINNATHAMBI, S.; LACHKE, A.H.; PANT, A. Isolation of an emulsifier from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 using a modified mini isoelectric focusing unit. **Letters in Applied Microbiology**. v. 24, n. 2, p. 117-121, 1997.

8 ANEXOS

Tabela 8.1. Variação do número de UFC, em base logarítmica, de *Gordonia amicalis* cultivada em meio GYP para a produção do CAS.

Tempo (horas)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio Padrão
0	11	10,21	10,9	10,7	0,43
3	10,75	11,41	10,99	11,05	0,33
6	11,82	12,59	11,41	11,94	0,60
9	11,55	11,57	11,72	11,62	0,09
12	12,06	12,05	11,79	11,97	0,15
18	11,93	11,92	11,94	11,93	0,01
24	12,04	11,99	12,09	12,04	0,05
36	11,8	12,02	12,1	11,97	0,16
48	12,13	12,17	12,18	12,16	0,03
60	12,21	12,57	12,15	12,31	0,23
72	12,29	12,3	12,21	12,27	0,05
84	12,32	12,28	12,21	12,27	0,06
96	12,35	12,23	12,42	12,33	0,10
108	12,26	12,24	12,2	12,23	0,03
120	12,34	12,24	12,26	12,28	0,05
150	12,19	12,17	12,23	12,2	0,03
170	12,25	12,36	12,47	12,36	0,11
192	12,19	12,22	12,16	12,19	0,03
216	12,58	12,53	12,56	12,56	0,03
240	12,15	12,24	12,17	12,19	0,05

Tabela 8.2 – Variação da DO ($\lambda = 600\text{nm}$) do meio GYP durante o crescimento de *Gordonia amicalis* para a produção do CAS

Tempo (horas)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio Padrão
0	0,2	0,2	0,2	0,2	0
3	0,297	0,314	0,316	0,309	0,01
6	0,638	0,673	0,587	0,633	0,04
9	0,615	0,694	0,772	0,694	0,08
12	0,821	0,596	0,85	0,756	0,14
15	0,931	0,98	0,941	0,951	0,03
18	0,906	0,756	0,735	0,799	0,09
24	1,096	1,023	1,022	1,047	0,04
60	1,11	1,163	1,063	1,113	0,05
72	1,062	1,12	1,02	1,067	0,05
84	1,044	1,1	0,817	0,987	0,15
96	0,887	0,813	0,815	0,838	0,04
108	0,915	0,822	0,786	0,841	0,07
120	0,935	1,065	0,95	0,983	0,07
150	1,113	1,247	1,166	1,175	0,07
170	1,062	1,128	1,069	1,086	0,04
192	1,249	0,976	1,001	1,075	0,15
216	1,234	1,159	1,26	1,218	0,05
240	1,106	0,934	1,094	1,045	0,10

Tabela 8.3 – Variação da Tensão superficial do meio GYP durante produção de CAS por *Gordonia amicalis*.

Tempo (horas)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio Padrão
3	43,4	46,8	42,9	44,37	2,12
6	43,2	42,2	41,2	42,20	1,00
9	43	43,7	42	42,90	0,85
12	42,5	44,6	41,9	43,00	1,42
15	42,6	43,8	41,4	42,60	1,20
18	42,3	43	41,7	42,33	0,65
24	43,2	43,2	43,3	43,23	0,06
36	43,1	44,6	43,2	43,63	0,84
48	44,4	44,1	42,1	43,53	1,25
60	42,1	43,5	42,6	42,73	0,71
72	43	43,7	42,4	43,05	0,65
84	44	44,3	42,3	43,53	1,08
96	43,8	43,7	42,5	43,33	0,72
108	43,8	42,5	43,1	43,13	0,65
120	44,5	41,9	42,2	42,87	1,42
150	43,3	41,6	42,1	42,33	0,87
170	42,8	40,4	41,8	41,67	1,21
192	44,1	41,5	38,5	41,37	2,80
216	42,9	41,4	41,8	42,03	0,78
240	41,9	42,4	41,8	42,03	0,32

Tabela 8.4- Variação do pH do meio GYP durante a produção do CAS por *Gordonia amicalis*.

Tempo (horas)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio Padrão
3	6,38	6,28	6,35	6,34	0,05
6	7,18	7,14	7,14	7,15	0,02
9	7,06	7,11	7,11	7,09	0,03
12	7,18	7,21	7,12	7,17	0,05
15	7,1	7,09	7,38	7,19	0,16
18	7,18	7,23	7,09	7,17	0,07
24	7,05	7,23	7,28	7,19	0,12
36	7,36	7,24	7,36	7,32	0,07
48	7,78	7,57	7,78	7,71	0,12
60	7,69	7,74	7,9	7,78	0,11
72	7,71	7,65	7,72	7,69	0,04
84	7,68	7,66	7,59	7,64	0,05
96	7,71	7,53	7,7	7,65	0,10
108	7,66	7,68	7,81	7,72	0,08
120	7,65	7,88	7,62	7,72	0,14
150	7,62	7,78	7,58	7,66	0,11
170	7,69	7,78	7,64	7,70	0,07
192	7,67	7,72	7,66	7,68	0,03
216	6,67	7,12	6,81	6,87	0,23
240	7,66	6,94	6,92	7,17	0,42