

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E PROPRIEDADES
DE BIOSURFACTANTES BACTERIANOS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Marta Mitsui Kushida, aprovada pela Comissão Julgadora em 31 de outubro de 2000.

Campinas, 31 de outubro de 2000



Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca

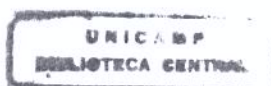
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

MARTA MITSUI KUSHIDA
Engenheira de Alimentos

Dr^a. LÚCIA REGINA DURRANT
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas/SP



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	KAG8c
V.	Ex.
TOMBO BC/	43406
PROC.	16-392101
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 10,00
DATA	09/09/02
N.º CPD	



CM-00153438-4

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

K968c Kushida, Marta Mitsui
Caracterização parcial e propriedades de biosurfactantes bacterianos / Marta Mitsui Kushida.—Campinas, SP: [s.n.], 2000.

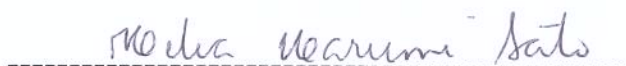
Orientador: Lúcia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Biosurfactantes. 2.Emulsões. 3.Bactérias.
4.Biodegradação. 5.Planococcus citreus. 6.Bacillus sp.
7.Pantoea agglomerans. I.Durrant, Lúcia Regina.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Dr.^a LÚCIA REGINA DURRANT
(Orientadora)



Dr.^a HÉLIA HARUMI SATO
(Membro)



Dr. RANULFO MONTE ALÉGRE
(Membro)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dr. FUMIO YOKOYA
(Membro)

People are often unreasonable, illogical and self-centered.

Forgive them anyway

If you are kind, people may accuse you of selfishness, ulterior motives.

Be kind anyway

If you are successful, you will win some false friends and some true enemies.

Succeed anyway

If you are honest and frank, people may cheat you.

Be honest and frank anyway

What you spend years building, someone could destroy overnight.

Build anyway

If you find serenity and happiness, people may be jealous.

Be happy anyway

The good you do today, people will often forget tomorrow.

Do good anyway

Give the world the best you have, and it may never be enough.

Give the world the best you've got anyway

You see, in the final analysis, it is between you and God.

It was never between you and them anyway

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.

Perdoe-as assim mesmo

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-la de egoísta, interesseira.

Seja gentil assim mesmo

Se você é uma vencedora, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.

Vença assim mesmo

Se você é honesta e franca, as pessoas podem enganá-la.

Seja honesta e franca assim mesmo

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.

Construa assim mesmo

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.

Seja feliz assim mesmo

O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.

Faça o bem assim mesmo

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.

Dê o melhor de você assim mesmo

Veja você que, no final das contas é entre você e Deus.

Nunca foi entre você e as outras pessoas.

MADRE TEREZA DE CALCUTÁ

AGRADECIMENTOS

A Dr^a. Lúcia Regina Durrant pela orientação, paciência e amizade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A Daniela pelo carinho, amizade e auxílio durante todas as etapas deste trabalho.

Ao pessoal da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos pelo auxílio, em especial ao Marcão e Jardete.

Ao pessoal da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelos empréstimos e atenção. A Cleuza pela simpática ajuda nas referências bibliográficas.

Ao Toninho, que sempre me atendeu com carinho. Deixa saudades.

A Rosinha pela ajuda.

Ao Hamilton, Érica, Fabiana, Andrea, Gabriela pelos inúmeros pedidos de socorro, sempre atendidos com carinho.

A todo o pessoal do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana.

A todos os professores da FEA responsáveis pela minha formação.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Obrigada, muito obrigada!

AGRADECIMENTO MUITO ESPECIAL

À três pessoas muito especiais:

Àquela que por diversos momentos ensinou-me como com coragem e muita resignação é possível encontrar forças, mesmo quando tudo parece não haver mais solução. Partiu para o mundo espiritual de uma forma injusta, não se entregando tão fácil às dificuldades que por vezes, ou muitas vezes, esta vida nos impõe, sem piedade.

Enquanto escrevo tenho ainda muito que concluir nesta etapa de minha vida e por diversas vezes penso que não conseguirei, mas já existe alguém pequenino que faz parte de minha vida e mais alguém surge como uma esperança no futuro e são pessoas por quem devo lutar e a quem devo dar os mesmos exemplos de fé, força e coragem.

Obrigada à minha mãe e meus filhos!

Mitsui de Almeida - * 15/01/1936 - † 22/12/1998

Lucas Ken Hiti Kushida - * 24/02/1996

Fernanda Mayumi Kushida – * 31/03/1999.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Obrigada a DEUS por todos os momentos em que guiaste meu caminho, sempre orientando-me e dando-me forças para superar mesmo os momentos mais difíceis e pela família maravilhosa que segue comigo.

Ao meu companheiro de todos os momentos Edson Makoto Kushida, pois sem ele não teria conseguido concluir mais esta etapa.

Ao Dr. Marcos Edigar de Almeida pelos conselhos, carinho, além de ser um ótimo irmão.

À meu pai Edigar de Almeida pelo apoio.

À D. Yoko Kushida pelo auxílio e carinho, a quem considero uma segunda mãe.

À todos os amigos que com carinho e paciência ouviram-me nos momentos difíceis e nos alegres estiveram presentes: Eliane, Edna, Carmen, Shizue, Célia, Nélida, .

Obrigada, muito obrigada!

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE DE TABELAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
SUMÁRIO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Natureza dos biosurfactantes.....	2
2.2. Microrganismos produtores de biosurfactantes	4
2.3. O uso de biosurfactantes em biorremediação.....	7
2.4. Modo de ação dos biosurfactantes	10
2.5. Detecção, extração e caracterização de biosurfactantes .	11
2.5.1. Detecção de biosurfactantes	11
2.5.2. Extração.....	13
2.5.3. Determinação de atividade do biosurfactante.....	15
2.5.4. Caracterização.....	16
3. MATERIAIS.....	21
3.1. Microrganismos	21
3.2. Meios de cultura.....	24
4. MÉTODOS.....	24
4.1. Manutenção das culturas.....	24
4.2. Condições de cultivo e obtenção do extrato bruto livre de células (EBLC).....	25
4.3. Determinação da atividade de emulsificação.....	26
4.4. Particularidades das cepas bacterianas em estudo.....	28
4.5. Produção de biosurfactante em diferentes temperaturas de cultivo.....	29

4.6. Influência da temperatura na estabilidade do biosurfactante do EBLC.....	29
4.7. Influência do pH na atividade do biosurfactante do EBLC	30
4.8. Influência da concentração do sal NaCl na atividade do biosurfactante do EBLC.....	30
4.9. Estudo da produção do biosurfactante em diferentes tempos de cultivo.....	30
4.9.1. Determinação da biomassa.....	32
4.9.1.1. Cepa B3G.....	32
4.9.1.2. Cepa 9.....	33
4.9.2. Determinação do pH do EBLC.....	33
4.9.3. Determinação do atividade de emulsificação.....	33
4.9.4. Determinação do óleo residual.....	34
4.9.5. Determinação da concentração de biosurfactante	36
4.10. Influência da fonte de carbono insolúvel na produção do biosurfactante.....	37
4.11. Teste CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio).....	37
4.12. Produção e extração do biosurfactante.....	38
4.12.1. Cepa 9.....	38
4.12.2. Cepa B3G.....	39
4.12.2.1. Extração com HCl.....	39
4.12.2.2. Extração com clorofórmio/metanol.....	40
4.12.2.3. Extração com clorofórmio.....	40
4.13. Análise do extrato liofilizado por cromatografia em camada delgada.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
5.1. Particularidades das cepas bacterianas em estudo.....	42
5.2. Produção do biosurfactante em diferentes temperaturas de cultivo.....	46
5.2.1. Cepa 9.....	46
5.2.2. Cepa B3G.....	47
5.3. Influência da temperatura na estabilidade do biosurfactante do EBLC.....	48
5.3.1. Cepa 9.....	48
5.3.2. Cepa B3G.....	49

5.4. Influência do pH na atividade do biosurfactante do EBLC.....	50
5.4.1. Cepa 9.....	50
5.4.2. Cepa B3G.....	51
5.5. Influência da concentração do sal NaCl na atividade do biosurfactante do EBLC.....	52
5.5.1. Cepa 9.....	52
5.5.2. Cepa B3G.....	53
5.6. Estudo da produção do biosurfactante em diferentes tempos de cultivo.....	54
5.6.1. Cepa 9.....	54
5.6.2. Cepa B3G.....	55
5.7. Influência da fonte de carbono na produção do biosurfactante.....	57
5.8. Teste CTAB (Brometo de Cetil Trimetil Amônio).....	58
5.9. Produção e extração do biosurfactante.....	59
5.9.1. Cepa 9.....	59
5.9.2. Cepa B3G.....	62
5.10. Análise do extrato liofilizado por cromatografia em camada delgada.....	65
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8. APÊNDICES.....	73
APÊNDICE A.....	73
APÊNDICE B.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Biosurfactantes produzidos por diversos microrganismos.....	6
TABELA 2: Caracterização de alguns biosurfactantes	20
TABELA 3: Descrição das cepas em estudo.....	21
TABELA 4: Halo de emulsão estabilizado por biosurfactante produzido por <i>Bacillus</i> sp em diversos tempos de cultivo em meio de cultura contendo 1,5 % de querosene.....	57
TABELA 5: Atividade de emulsificação para biosurfactante produzido por <i>Planococcus citreus</i> (9), extraído com clorofórmio/metanol.....	61
TABELA 6 : Atividade de emulsificação para biosurfactante produzido por <i>Bacillus</i> sp (B3G) extraído por precipitação ácida.....	63
TABELA 7: Atividade de emulsificação para biosurfactante produzido por <i>Bacillus</i> sp (B3G), extraído com solventes.....	64
 APÊNDICE	 73
TABELA A1: Testes bioquímicos para identificação das cepas.....	73
TABELA B1: Produção de biosurfactante por <i>Pantoea agglomerans</i> cultivada em 1,5 % de querosene em diferentes tempos de cultivo.....	74
TABELA B2: Produção de biosurfactante por <i>Planococcus citreus</i> cultivada em 1,5 % de óleo de oliva em diferentes tempos de cultivo.....	74
TABELA B3: Produção de biosurfactante por <i>Bacillus</i> sp cultivada em 1,5 % de óleo de soja em diferentes tempos de cultivo.....	75
TABELA B4: Efeito da temperatura de cultivo na produção de biosurfactante pelas cepas 9 e B3G em meio de cultura contendo 1,5 % de óleo de oliva e óleo de soja respectivamente.....	75
TABELA B5: Efeito da temperatura na estabilidade do biosurfactante dos EBLC obtidos das linhagens <i>Planococcus citreus</i> e <i>Bacillus</i> sp	76

TABELA B6: Efeito do pH na atividade do biosurfactante do EBLC produzido pela linhagem <i>Planococcus citreus</i> (9).....	76
TABELA B7: Efeito do pH na atividade do biosurfactante do EBLC produzido pela linhagem <i>Bacillus</i> sp (B3G).....	77
TABELA B8: Efeito da concentração do sal NaCl na atividade do biosurfactante do EBLC produzido pelas linhagens <i>Planococcus citreus</i> e <i>Bacillus</i> sp.....	77
TABELA B9: Efeito do tempo de cultivo na produção do biosurfactante pela linhagem <i>Planococcus citreus</i> em meio contendo 1,5 % de óleo de oliva.....	78
TABELA B10: Efeito do tempo de cultivo na produção do biosurfactante da linhagem <i>Bacillus</i> sp em meio contendo 1,5 % de óleo de soja.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Óleo na areia e na água (Baía de Guanabara- janeiro 2000).....	8
FIGURA 2: Pássaro atingido – desastre ecológico.....	8
FIGURA 3: <i>Planococcus citreus</i> (cepa 9) inoculada em placa de Petri contendo GYP com 48 horas de incubação.....	23
FIGURA 4: <i>Bacillus</i> sp (cepa B3G) inoculada em placa de Petri contendo NA com 48 horas de incubação.....	23
FIGURA 5: Classificação visual do halo da camada de emulsificação (água/óleo) em valores de 0 até ++++...	27
FIGURA 6: Obtenção de atividade de emulsão através de atividade óptica (A_{610}) e Halo de emulsificação (Halo (cm)).....	28
FIGURA 7: Análise da produção de biosurfactante.....	32
FIGURA 8: Quantificação do óleo residual – método de Bligh e Dyer.....	35
FIGURA 9: Quantificação do biosurfactante – método de Bligh e Dyer.....	36
FIGURA 10: Atividade de emulsificação e pH do meio de cultura contendo 1,5 % de querosene inoculado com <i>Pantoea agglomerans</i> em diferentes tempos de cultivo.....	43
FIGURA 11: Atividade de emulsificação e pH do meio de cultura contendo 1,5 % de óleo de oliva inoculado com <i>Planococcus citreus</i> em diferentes tempos de cultivo..	45
FIGURA 12: Atividade de emulsificação e pH do meio de cultura contendo 1,5 % de óleo de soja inoculado com <i>Bacillus</i> sp em diferentes tempos de cultivo	46
FIGURA 13: Efeito da temperatura de cultivo na produção de biosurfactante pela cepa <i>Planococcus citreus</i>	47
FIGURA 14: Efeito da temperatura de cultivo na produção de biosurfactante pela cepa <i>Bacillus</i> sp.....	48
FIGURA 15: Efeito da temperatura na estabilidade do biosurfactante produzido por <i>Planococcus citreus</i>	49
FIGURA 16: Efeito da temperatura na estabilidade do biosurfactante de <i>Bacillus</i> sp.....	50
FIGURA 17: Efeito do pH na atividade do biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i>	51

FIGURA 18: Efeito do pH na atividade do biosurfactante de <i>Bacillus</i> sp.....	52
FIGURA 19: Efeito da concentração do sal NaCl na atividade do biosurfactante de <i>Planococcus citreus</i>	53
FIGURA 20: Efeito da concentração do sal NaCl na atividade do biosurfactante de <i>Bacillus</i> sp.....	53
FIGURA 21: Efeito do tempo de cultivo na produção de biosurfactante pela linhagem <i>Planococcus citreus</i> em meio contendo 1,5 % de óleo de oliva.....	55
FIGURA 22: Efeito do tempo de cultivo na produção de biosurfactante pela linhagem <i>Bacillus</i> sp em meio contendo 1,5 % de óleo de soja.....	56
FIGURA 23: Halo de emulsão estabilizado por biosurfactante produzido por <i>Bacillus</i> sp em diversos tempos de cultivo em meio contendo 1,5 % de óleo de soja.....	56
FIGURA 24: Halo de emulsão estabilizado por biosurfactante produzido por <i>Bacillus</i> sp em diversos tempos de cultivo em meio de cultura contendo 1,5 % de querosene	58
FIGURA 25: Meio de cultivo contendo o biosurfactante produzido por <i>Planococcus citreus</i> em 300 ml de meio de sais e 1,5 % de óleo de oliva, incubado a 30 °C/150 rpm/48 horas.....	60
FIGURA 26: Atividade de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Planococcus citreus</i>	62
FIGURA 27: Atividade de emulsificação do biosurfactante produzido por <i>Bacillus</i> sp.....	64
FIGURA 28: Cromatografia em camada delgada dos extratos liofilizados de <i>Planococcus citreus</i> e <i>Bacillus</i> sp.....	66

SUMÁRIO

O interesse pelos biosurfactantes tem aumentado neste final de século, principalmente por suas características superiores aos agentes emulsificantes químicos convencionais, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, especificidade e síntese a partir de material renovável e de baixo custo, encontrando larga faixa de aplicações, principalmente em biorremediação, já que sabemos como são graves os problemas como vazamento de óleo que ocorrem durante o transporte dos mesmos para locais de consumo, assim como o despejo de efluentes pelas indústrias.

No Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM) foram selecionadas cepas produtoras de biosurfactantes, sendo que *Planococcus citreus* (9), *Pantoea agglomerans* (B1A) e *Bacillus* sp (B3G) apresentaram uma atividade emulsificante potencial, produzindo biosurfactante quando crescem em óleo de oliva, querosene e óleo de soja, respectivamente.

Foram analisadas as propriedades dos biosurfactantes produzidos pelas cepas bacterianas, tais como influência de temperatura, pH, concentração de sais, etc. sobre os agentes emulsificantes.

SUMMARY

Interest in biosurfactants increased at the end of the 20th century because of their superior qualities to conventional chemical emulsifiers, such as low toxicity, biodegradability, specificity and synthesis from low cost renewable material, finding many applications, principally in biorremediation, where grave problems, such as oil leaks during transport to points of consumption, as well as the discharging of effluents by industry occur.

At the Systematic and Microbial Physiology Laboratory (SMPL) the selected biosurfactant-producing strains *Planococcus citreus* (9), *Pantoea agglomerans* (B1A) and *Bacillus* sp (B3G) presented potencial emulsifying activities, producing biosurfactant when grow in olive oil, kerosene and soya oil, respectively.

The properties of the biosurfactants produced by the bacterial strains where analyzed, together with the influence of temperature, pH, salt concentration, etc, on the emulsifying agents.

1. INTRODUÇÃO

BIOTECNOLOGIA E BIOSURFACTANTES:

Tem sido grande o interesse neste final de século pela biotecnologia, ou seja, pela utilização da matéria viva para a degradação, bioconversão ou biossíntese visando a aplicação industrial, desta forma obtendo-se um bom rendimento econômico.

São numerosas as aplicações de microrganismos, sejam na produção de enzimas, biocatalizadores, ou utilização “in situ”, tais como nas indústrias de fermentações, químicas, farmacêuticas, alimentícias, agrícolas, de efluentes e diversas outras.

Os produtos dos microrganismos podem ser utilizados como agentes estabilizantes de alimentos, emulsificantes, vitaminas, proteínas, agentes espumantes, “flavorizantes”, etc.

Os surfactantes provenientes de derivados petroquímicos e lipídeos de plantas e animais tem um elevado custo de produção e com a crescente demanda mundial tem-se buscado fontes alternativas, recaindo-se dessa forma um aumento no interesse por microrganismos produtores de substâncias com propriedades de superfície ativa, alvo deste estudo.

Existem duas classes principais de surfactantes: os quimicamente sintetizados e os produzidos biologicamente (biosurfactantes) **(HOROWITZ et al. –1990)**. Os surfactantes são largamente utilizados em uma grande variedade de aplicações industriais, tais como indústrias de óleos, farmacêuticas, papéis, cosméticas, alimentos, bebidas,

agricultura, construção, plásticos, limpeza industrial e doméstica (**DZIEZAK – 1988**).

Os surfactantes produzidos biologicamente oferecem propriedades superiores aos compostos quimicamente sintetizados, devido principalmente a sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, especificidade, presença de estruturas variadas e facilidade de síntese a partir de material renovável e de baixo custo, porém sua purificação ainda tem sido o maior custo.

Os biosurfactantes são produzidos por microrganismos diversos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) provenientes de diferentes “habitats”, sendo sua ação normalmente ligada à solubilização de lipídeos (**CARRILLO et al. – 1996**).

Esses microrganismos produtores de compostos de superfície ativa, normalmente os produzem a partir do crescimento em substratos insolúveis em água (hidrocarbonetos, óleos ou graxas) ou substratos solúveis (carboidratos) como fonte de carbono.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. NATUREZA DOS BIOSURFACTANTES:

Surfactantes são moléculas que tendem a se concentrar na interface entre duas fases imiscíveis e alterar suas propriedades interfaciais. São moléculas anfipáticas, possuindo duas partes funcionais uma cabeça hidrofílica (polar) e uma cauda lipofílica (apolar) (**HOROWITZ et al. – 1990**). A metade lipofílica consiste numa cadeia

hidrocarboneto de um ácido graxo. O grupo hidrofílico pode ser derivado de um éster ou um grupo funcional alcoólico de um lipídeo neutro, de grupo carboxílico de um ácido graxo ou aminoácido, ou da porção contendo fosfato de fosfolipídeos ou carboidratos de glicolipídeos (**KOSARIC et al. – 1987**).

As moléculas de surfactantes, quando em solução, tendem a se agregarem umas com as outras (formando micelas) ou entre fases de diferentes polaridades, tais como óleo/água (**HOROWITZ et al. – 1990**).

Os biosurfactantes são compostos produzidos na superfície celular microbiana ou excretados extracelularmente (**VAN DYKE et al. – 1991**), quando são cultivados sob várias fontes de carbono, em particular durante o crescimento na presença de substratos hidrofóbicos, sendo que neste caso sua produção pode estar associada com emulsificação do hidrocarboneto, quando extracelular, ou serve para facilitar a penetração dos hidrocarbonetos no espaço periplasmático, quando associado à célula (**KOSARIC et al. – 1987**), desde que o principal problema na degradação destes substratos pelos microrganismos é a sua insolubilidade em água.

Basicamente, há seis classes principais de biosurfactantes:

1. Glicolipídeos
 2. Lipopeptídeos / lipoproteínas
 3. Fosfolipídeos
 4. Lipídeos neutros e ácidos graxos substituídos (hidroxilados ou com ligações cruzadas)
 5. Lipopolissacarídeos complexos.
 6. Biosurfactantes ligados à parede celular.
- (**KOSARIC et al. – 1987**).

2.2. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES:

Normalmente, as cepas produtoras de biosurfactantes são isoladas de solos contaminados com óleo, resíduos efluentes de refinarias, esgotos, água de mar e plantas.

O “screening” de microrganismos produtores de biosurfactantes é geralmente feito com parâmetros que estimam a atividade superficial, tais como tensão superficial, tensão interfacial e a habilidade de emulsificar óleos ou hidrocarbonetos, garantindo a detecção de cepas produtoras.

Muitas espécies de microrganismos têm sido descritas como produtoras de agentes de superfície ativa. A atividade superficial é observada com um substancial abaixamento da tensão superficial do meio de cultura, uma emulsificação do meio ou fenômenos relacionados, sendo que muitos tipos de biosurfactantes têm sido isolados e caracterizados.

Diversos biosurfactantes tem sido caracterizados quanto ao tipo, quantidade e qualidade, sendo que estes podem ser influenciados quanto a natureza da fonte de carbono, condições de cultivo, tais como pH, temperatura, agitação e taxa de diluição em culturas contínuas (BANAT – 1995).

Uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são conhecidos como produtores de biosurfactantes. Enquanto fungos filamentosos e leveduras utilizam preferencialmente n-alcanos saturados, não ramificados, algumas bactérias degradam

isoalcanos e cicloalcanos, assim como compostos insaturados e aromáticos (**KOSARIC et al. – 1987**).

Bacillus subtilis e outras espécies de *Bacillus* são conhecidas como produtoras de lipopeptídeos. O melhor lipopeptídeo caracterizado é a surfactina (também denominada de subtilisina e serosina), produzida por algumas cepas de *Bacillus subtilis*.

Bacillus licheniformis JF-2 produz um lipopeptídeo denominado lichenisina, que foi patenteada como um agente para utilização em MEOR (“microbial enhanced oil recovery”) (**COOPER et al. – 1987**).

Quimicamente os surfactantes microbianos descritos mais comuns, são glicolipídeos, particularmente lipídeos ligados a dissacarídeos (trealose e soforose), monossacarídeos (ramnose), diglicosil diglicerídeos ou polissacarídeos. *Pseudomonas aeruginosa* produz ramnolipídeos extracelulares os quais diferem em seu conteúdo de ramnose e o comprimento e natureza química de sua fração lipídica, dependendo da cepa, meio de cultura e condições de crescimento (**ROCHA et al. – 1992**). Também tem sido reportado a produção de soforoselipídeo por *Candida* sp.

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de biosurfactantes e respectivos microrganismos produtores.

TABELA 1: Biosurfactantes produzidos por diversos microrganismos:

BIOSURFACTANTE	TIPO	MICRORGANISMO
Sophorose lipídeo	Glicolipídeo	<i>Torulopsis bombicola</i>
Rhamnose lipídeo	Glicolipídeo	<i>P. aeruginosa</i>
Surfactina	Lipoproteína	<i>B. licheniformis</i>
Surfactina	Lipoproteína	<i>B. subtilis</i>
Rhamnose lipídeo	Glicolipídeo	<i>Pseudomonas</i> sp
	Sacarose e frutose glicolipídeo	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
	Glicolipídeo	<i>Arthrobacter</i>
Rhamnose lipídeo		<i>P. fluorescens</i>
	Glicolipídeo ou proteína	<i>Torulopsis bombicola</i>
Complexo ácido graxo – polissacarídeo		<i>Candida tropicalis</i>
Ácido corinomicólico		<i>Corynebacterium lepus</i>
Ácidos graxos, mono e diglicérides		<i>Acinetobacter</i> sp
Emulsan	Lipoheteropolissacarídeo	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Lipopeptídeo associado a célula	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 2CAC
Liposan	93 a 98% de carboidratos e 2 a 7 % de proteínas. Não foram detectados ácidos graxos	<i>Candida lipolytica</i>
Peptolipídeo		<i>Candida petrophilum</i>
Lipídeos neutros		<i>Nocardia erythropolis</i>
Trealose dimicolato		<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipídeo neutro		<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC
Complexo proteína – polissacarídeo		<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>

Fonte: (KOSARIC et al. – 1987).

2.3. O USO DE BIOSURFACTANTES EM BIORREMEDIAÇÃO:

Têm ocorrido muitos acidentes com derramamento de óleo em alto mar e praias, que tem resultado em enormes catástrofes ecológicas e sociais. Tem-se demonstrado que as propriedades emulsificantes podem aumentar a degradação de hidrocarbonetos no meio ambiente, tornando os biosurfactantes um poderoso instrumento no controle da poluição de derramamento de óleos (**BANAT – 1995**).

Um dos acidentes que mais tem sido citado na literatura científica é o derramamento de óleo ocorrido em 1990 dos tanques de óleo do cargueiro Exxon Valdez no Alasca (**HARVEY et al. – 1990**). O transporte de óleo dos locais de produção para os locais de consumo reflete claramente os problemas causados por acidentes como este, sendo causa de destruição do “habitat” de animais e plantas aquáticos, bem como devastação de toda a fauna e flora circundante, assim como leva também a riscos de saúde para os habitantes locais. As técnicas mais utilizadas têm sido o uso de dispersantes químicos e uso de água quente sob pressão para lavar o óleo de cascalho e pedras, sendo que a primeira envolve compostos tóxicos e persistentes na natureza e a segunda é um processo caro, demorado e não efetivo.

Aqui no Brasil podemos citar inúmeros exemplos de acidentes desta natureza, tais como o choque entre navios no cais do porto de Santos em julho de 1998, levando ao derramamento de mais de duas toneladas de óleo combustível, provocando uma mancha de mais de cinco quilômetros de extensão. Ou em abril de 1999, onde seis praias da região de São Sebastião (litoral norte de São Paulo) foram afetadas por

um derramamento de petróleo, vazado de um emissário submarino da Petrobrás. Recentemente, em janeiro de 2000, recebemos a notícia de mais um desastre ecológico, onde a baía de Guanabara apareceu coberta por uma mancha de óleo de cerca de 40 quilômetros quadrados, atingindo a área de proteção ambiental de Guapimirim, provocada pelo vazamento de 800 mil litros combustível de um duto da Petrobrás (figuras 1 e 2) (**VEJA, ISTO É, JORNAL DA TARDE E O ESTADO DE SÃO PAULO**).

As técnicas citadas para combater estes acidentes têm sido a utilização de barreiras de contenção e uso de absorventes e um sistema de recolhimento de óleo, utilizando-se caminhões de sucção.



FIGURA 1: Óleo na areia e na água (baía de Guanabara – janeiro de 2000).



FIGURA 2: Pássaro atingido – desastre ecológico.

Um dos usos para biosurfactantes que tem recebido especial atenção é a utilização em MEOR (“microbial enhanced oil recovery”), cujo processo consiste em introduzir o microrganismo, que pode ser estimulado a produzir o biosurfactante diretamente, e/ou introduzir parte de seus produtos dentro do reservatório de óleo, aumentando desta forma a mobilização do óleo dentro dos tanques (BANAT –1995).

Muitos autores citam o uso do biosurfactante “in situ” como uma característica importante, pois os custos tornar-se-iam menores, já que muitos reservatórios de petróleo são anaeróbicos e tem alta salinidade e alta temperatura, além disso, a caracterização de cepas que possam produzi-lo anaerobicamente (adequado para utilização “in situ”) a altas temperaturas (superiores a 50 °C), concentrações de sais superiores a 10 %, e uma ampla faixa de pH (4,0 a 9,0), condições típicas de muitos reservatórios de óleos também é uma condição importante.

Outro problema que merece especial atenção é o tratamento de efluentes industriais, visando um maior controle ambiental.

A utilização de bactérias selecionadas, não patogênicas e não transgênicas, que degradam resíduos de forma específica, visando melhorar a eficiência dos sistemas de tratamento de efluentes é uma técnica ainda pouco utilizada no Brasil, mas que vem ganhando interesse aos poucos (SPRINGMANN –1996).

Nas indústrias de alimentos onde existem resíduos protéicos e lipídicos em grande quantidade (abatedouros, frigoríficos, laticínios, etc.), a utilização desta técnica pode ser de grande valia.

O processo consiste na inoculação de microrganismos selecionados diretamente nos efluentes a serem tratados.

Desde que o uso de microrganismos possa acontecer de uma forma controlada, sempre tomando-se o cuidado de não lançar no meio ambiente espécies não naturais ou diferentes das existentes, esta técnica torna-se bastante interessante. Leva-se em conta também a possibilidade da utilização do biosurfactante em si, avaliando-se sempre a relação custo/benefício.

2.4. MODO DE AÇÃO DOS BIOSURFACTANTES:

Muitos modelos têm sido propostos para a degradação de hidrocarbonetos pelas células. Entre estes se incluem: 1) degradação do hidrocarboneto dissolvido na fase aquosa; 2) necessidade de contato direto entre células e gotas de óleo; 3) formação de gotículas de óleo ou micelas.

Algumas bactérias e leveduras excretam surfactantes iônicos, os quais emulsificam o hidrocarboneto no meio de crescimento. Ex: raminolipídeos, produzidos por diferentes espécies de *Pseudomonas*, ou soforolipídeos, produzidos por diversas espécies de *Torulopsis*. Por outro lado há microrganismos capazes de mudar a estrutura de sua parede celular. Eles conseguem isto por produção de lipopolissacarídeos ou surfactantes não iônicos em sua parede celular. Neste grupo encontramos *Candida lipolytica* e *Candida tropicalis* que produzem um lipopolissacarídeo ligado à parede celular quando crescem em n-alcanos

e *Rodhococcus erythropolis* e muitas espécies de *Mycobacterium* e *Arthrobacter*, os quais sintetizam trealose corinomicolatos não iônicos.

Em todos os casos os microrganismos chegam ao mesmo efeito: eles facilitam a difusão passiva do hidrocarboneto para dentro da célula. Isto é uma explicação para o grande espectro de diferentes substâncias produzidas por microrganismos, os quais são chamados de biosurfactantes.

São eles lipopolissacarídeos como emulsan, sintetizados por espécies de *Acinetobacter*, e lipoproteínas ou lipopeptídeos como surfactina (ou subtilisina), produzidas por *Bacillus subtilis*. Outros surfactantes microbianos efetivos são micolatos e corynomicolatos, os quais podem ser encontrados em espécies de *Corynebacteria*, *Mycobacteria* e *Nocardia*, e ornitinlipídeos os quais podem ser isolados de *Pseudomonas rubescens*, *Gluconobacter cerineus* e *Thiobacillus ferrooxidans*. O maior grupo entre os biosurfactantes são os glicolipídeos (KOSARIC et al. – 1987).

2.5. DETECÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES:

2.5.1. DETECÇÃO DE BIOSURFACTANTES:

Técnicas para o isolamento e detecção de diferentes tipo de emulsificante tem sido descritas, como a utilizada por **DITTMER e LESTER (1964)** para a detecção de fosfolipídeos (éster de fosfato), no qual os fosfolipídeos são aplicados em placas de cromatografia em camada delgada (TLC) com CHCl_3 / CH_3OH (4:1) e borrifadas com uma solução de molibdênio, sendo a visualização do éster de fosfato

imediate como manchas azuis. Utilizaram também borrifamento com solução de ninidrina a qual é específica para amino grupos e solução de rodamina 6G que é um detector universal para lipídeos.

SIEGMUND e WAGNER (1991) desenvolveram um método semi-quantitativo de placas de ágar para detecção de biosurfactantes aniônicos, onde utilizam um tensoativo catiônico, brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e o corante básico azul de metileno. Consiste na formação de um par iônico insolúvel entre o biosurfactante aniônico e CTAB-azul de metileno, sendo a visualização através da formação de um halo azul escuro em torno da colônia produtora de biosurfactante. O método foi utilizado para identificação de raminolipídeos de *Pseudomonas* sp, podendo também ser utilizados para detectar soforoselipídeos ou celobioselipídeos. Desta forma o método pode ser utilizado para avaliação de outros glicolipídeos produzidos por microrganismos. Em alguns casos o método precisa ser modificado, devido ao fato de CTAB inibir o crescimento de muitas bactérias.

Na detecção de lipopeptídeos bacterianos **SHULGA et al (1993)** descreveram um método baseado na habilidade do surfactante aniônico em formar um complexo colorido com o indicador catiônico azul de metileno.

CARRILLO et al. (1996) realizaram um “screening” com vários tipos de microrganismos provenientes do solo e matéria orgânica. Utilizando a metodologia de placas de ágar sangue, sendo a atividade hemolítica detectada como a presença de uma zona clara definida em torno da colônia. Das 492 bactérias isoladas, somente 37 apresentavam

atividade hemolítica e destas apenas cinco foram capazes de reduzir a tensão superficial do meio de cultura. Estimou também a biomassa espectrofotometricamente como A_{580} . Realizou medidas de tensão superficial e determinou a CMC (concentração micelar crítica) do biosurfactante, bem como extração com etil-acetato, sendo que o sobrenadante obtido recuperou seu valor inicial de tensão superficial e o extrato foi capaz de reduzir a tensão superficial da água.

2.5.2. EXTRAÇÃO:

Em relação à extração de glicolipídeos de culturas microbianas, eles podem ser extracelulares ou associadas à parede celular. Quando os glicolipídeos são excretados no meio, geralmente eles possuem um caráter iônico.

Têm-se estudado diversas técnicas para a extração do biosurfactante, como por exemplo, os glicolipídeos que podem ser obtidos da massa celular ou do sobrenadante com diferentes solventes como etil acetato, éter, pentano, hexano, clorofórmio / metanol ou diclorometano / metanol. Após remoção do solvente por rotoevaporação, o produto cru pode ser purificado por coluna cromatográfica, TLC e cristalização. Dentre estes podemos citar **COOPER e GOLDENBERG** que em 1987 isolaram um bioemulsificante extracelular de *Bacillus* sp e um polissacarídeo e monoglicerídeo de *Bacillus cereus*, utilizando 3 volumes de metanol. O precipitado obtido foi seco a 105 °C ou **ROCHA et al.** que em 1992 extraíram um ramnolipídeo de duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando clorofórmio / metanol / sobrenadante na proporção (2:1:3) v/v. Já **ASHTAPUTRE e SHAH (1995)** extraíram um

exopolissacarídeo (EPS) de *Sphingomonas paucimobilis*, sendo que após crescimento o caldo de cultura foi diluído 30 vezes com água e centrifugado. Ao sobrenadante foi adicionado 3 volumes de acetona e o precipitado foi então seco. Estudando a produção de biosurfactante extracelular de vários microrganismos, **CARRILLO et al. (1996)** fizeram a extração utilizando-se 200 ml do caldo livre de células com igual volume de etil-acetato. O solvente foi removido por destilação a pressão reduzida e o produto seco.

A precipitação de biosurfactantes também é possível no caso de compostos protéicos, tais como emulsan, utilizando-se a adição de sulfato de amônio ao sobrenadante, seguido de filtração. Este método foi utilizado por **NAVON- VENEZIA et al.** que em 1995 isolaram um biosurfactante produzido por *Acinetobacter radioresistens* KA53, o qual foi denominado Alasan. O sobrenadante do meio de cultura foi saturado 65 % com sulfato de amônio e deixado em repouso por 24 horas a 4°C e centrifugado. Após diálise o precipitado foi liofilizado.

Em alguns casos, glicolipídeos extracelulares com boa solubilidade em água podem ser obtidos do sobrenadante por precipitação por abaixamento do pH e temperatura.

Biosurfactantes de espécies de *Bacillus* tem sido extraídos do sobrenadante do meio de cultura por acidificação até pH 2,0 com HCl, o qual é mantido à 4 °C por uma noite, obtendo-se um precipitado, o qual é recuperado por centrifugação. **JAVAHERI et al. (1985)** após obter este precipitado de uma cepa de *Bacillus licheniformis* por esta técnica, dissolveram-no em água destilada e ajustaram o pH para 7,0

com NaOH 1 N e a solução foi liofilizada. **HOROWITZ et al. (1990)** obtiveram este precipitado ácido de *Bacillus licheniformis* 86, sendo o precipitado lavado 4 vezes com água ácida (pH 2,0 por HCl) seguido de liofilização por uma noite. Um lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* foi isolado por **JENNY et al. (1991)** por este mesmo método. Em seguida o precipitado foi dissolvido em 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e purificado em uma coluna de Amberlite. Os compostos de superfície ativa foram eluidos da coluna com metanol e analisados por medida da tensão superficial no final da coluna. Através da mesma técnica de abaixamento do pH com HCl, **VAN DYKE et al. (1993)** conseguiram isolar um rhamnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, sendo o precipitado branco removido por centrifugação e congelado. **YAKIMOV et al. (1995)** estudando *Bacillus licheniformis* BAS 50 isolaram um lipopeptídeo denominado lichenisina A. Após liofilização, o surfactante foi extraído com tetrahidrofurano e o solvente removido com auxílio de um rotoevaporador.

2.5.3. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DO BIOSURFACTANTE:

Quanto a determinação da atividade, diversos parâmetros tem sido utilizados, como os métodos visuais, descrito por **BRODERICK e COONEY (1981)** que isolaram 129 culturas de lagos com várias histórias de poluição por hidrocarbonetos. Utilizaram três métodos para quantificar a capacidade de emulsificação, sendo que o método envolvendo a agitação, seguido de inspeção visual, obteve o melhor resultado. A quantidade de emulsificação estimada visualmente foi

graduada na escala de 0 até +++++. Este método foi também utilizado por **CARVALHO et al. (1996, 1997, 1998)** que isolaram e identificaram microrganismos produtores de biosurfactante extracelular e estudaram sua produção em meios contendo várias fontes de carbono como substrato. Destes estudos foram selecionadas as três cepas utilizadas neste trabalho de caracterização. A atividade foi expressa em centímetros de camada de emulsão (água/óleo) como sugerido por **COOPER et al. (1987)** e **BRODERICK et al. (1981)**.

Métodos espectrofotométricos também tem sido utilizados, sendo a atividade expressa em termos de D.O. (densidade ótica), como descrito por **CARVALHO et al. (1996, 1997, 1998)** e **ASHTAPUTRE e SHAH (1995)**. Ambas as técnicas foram empregadas neste trabalho.

2.5.4. CARACTERIZAÇÃO:

A caracterização de um biosurfactante é realizada através de sua habilidade em reduzir a tensão superficial, pela determinação da concentração micelar crítica (CMC), tensão superficial e interfacial **HOROWITZ et al. – (1990)**.

Os surfactantes químicos são geralmente classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar (catiônicos, aniônicos e não-iônicos), enquanto que os biosurfactantes são geralmente caracterizados por sua composição química e/ou pelo microrganismo produtor. O caráter de todos os biosurfactantes são não-iônicos ou aniônicos, sendo os biosurfactantes catiônicos desconhecidos na literatura.

Biosurfactantes de várias espécies de *Bacillus* têm sido caracterizados. **JAVAHERI et al. (1985)** estudaram a linhagem *Bacillus licheniformis* JF-2 que produz um biosurfactante aniônico (aeróbica e anaerobicamente). Foram feitas medidas de CMD^{-1} , que é a recíproca da diluição na qual observa-se um aumento na tensão superficial, ou seja, é a recíproca da diluição necessária para se obter a CMC (concentração micelar crítica). Os autores chegaram a conclusão de que o biosurfactante produzido aerobicamente é provavelmente o mesmo do produzido anaerobicamente. Através de análise por cromatografia em camada delgada e revelação com ninidrina e rodamina B, ambas reações positivas, concluíram ser um indicativo da presença de um amino grupo livre e uma metade lipídica.

Duas espécies de *Bacillus* isoladas de óleo e reconhecidas como produtoras de bioemulsificantes foram estudadas por **COOPER e GOLDENBERG (1987)**. A linhagem *Bacillus* sp IAF 343 produziu um biosurfactante extracelular não usual quando cresceu num meio contendo somente substrato solúvel em água. Esse bioemulsificante apresentou uma excelente emulsificação com querosene, porém não reduziu apreciavelmente a tensão superficial da água. A linhagem *Bacillus cereus* IAF 346 produziu dois agentes de superfície ativa com propriedades bem diferentes: um polissacarídeo bioemulsificante convencional que estabilizou emulsão óleo/água e uma mistura homóloga de monoglicerídeos biosurfactante. Para ambas as cepas o meio de fermentação continha apenas substratos solúveis em água, sendo que os autores sugeriram que os bioemulsificantes não são

produzidos pelos microrganismos para facilitar a ingestão do substrato insolúvel.

HOROWITZ et al. (1990) isolaram um biosurfactante denominado BL86 produzido pela linhagem *Bacillus licheniformis* 86 e compararam com os produzidos pelas linhagens *Bacillus subtilis* ATCC 21332 e *Bacillus licheniformis* ATCC 39307.

Outros microrganismos produtores de biosurfactantes têm sido descritos na literatura. A linhagem *Candida tropicalis* estudada por **SINGH et al. (1990)** produziu um bioemulsificante extracelular através da utilização de n-hexadecano como fonte de carbono, sendo que alta atividade de emulsificação foi detectada quando as condições de crescimento eram limitadas quanto a nitrogênio, o mesmo acontecendo quando o bioemulsificante era extraído com água quente (80 –90 °C).

Rhodotorula glutinis IIP-30 produtor de um emulsificante extracelular associado ao crescimento utilizando glucose como fonte de carbono sob condições limitantes de nitrogênio foi estudada por **VON JOHNSON et al. - 1992**.

Duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de campos de óleo na Venezuela foram estudadas por **ROCHA et al. (1992)**, sendo que ambos biosurfactantes assemelhavam-se a ramnolipídeos, produzindo emulsões estáveis.

A linhagem *Sphingomonas paucimobilis* – GS1 produz um exopolissacarídeo (EPS), o qual emulsifica diversos tipos de hidrocarbonetos e óleos vegetais, melhor do que gomas comerciais,

sendo que uma solução de 4 g/l de EPS apresenta uma alta viscosidade e natureza pseudoplástica. EPS não reduz significativamente a tensão interfacial, indicando que seu principal efeito estabilizador não foi devido a suas propriedades de superfície ativa. Os emulsificantes não iônicos e gomas estabilizam emulsões pela formação de um filme interfacial que previne a coalescência das gotículas dispersas (ASHTAPUTRE e SHAH - 1995).

Uma linhagem de *Acinetobacter radioresistens* produziu um agente emulsificante extracelular denominado Alasan, quando foi cultivada em um meio de crescimento com etanol, que estabilizou diversas emulsões óleo/água. Um aspecto interessante é que este emulsificante apresenta um aumento na atividade quando aquecido a 100 °C sob condições neutras ou alcalinas. Caracterização química preliminar de Alasan indica que ele é um complexo aniônico de alto peso molecular, contendo heteropolissacarídeo e proteína (NAVON- VENEZIA et al. - 1995).

A tabela 2 apresenta a produção de alguns biosurfactantes por microrganismos, bem como algumas de suas características.

TABELA 2: Produção de biosurfactantes por microrganismos. Rendimento na extração e características dos biosurfactantes (CMC, tensão superficial, tensão interfacial, estabilidade do emulsificante frente a pH, temperatura e concentrações de sais):

Microorganismo	Biosurfactante	Rendimen- to	TS (mN/m)	TIF (mN/m)	CMC (µg/l)	Estabilidade quanto ao:			Referência
						pH	T (°C)	[sais] (g/l)	
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	Aniônico (lichenisina)	0,1 a 0,7 g/l (a)	28	0,05 mN/m (b)	0,02 mg/ml	Não é afetado	> 50 °C não é afetado	Não é afetado	Javaheri, M. et al. (1985)
<i>Bacillus cereus</i> - IAF 346	Monoglicéridos + polissacarídeos	1,6 g/l	28	ND	ND	Abaixo de 7,0	ND	ND	Cooper, D.G. e Goldenberg, B. G. (1987)
<i>Bacillus</i> sp - IAF 343	Extracelular	1,0 g/l	53 (porém boa emulsifica- ção)	ND	ND	Entre 4,0 e 8,0	ND	ND	Cooper, D.G. e Goldenberg, B. G. (1987)
<i>Bacillus licheniformis</i> 86	ND	22mg/l	27	ND	10	ND	ND	ND	Horowitz, S. et al. (1990)
<i>Candida tropicalis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	80-90	ND	Sing, M. et al. (1990)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolípido	ND	28	ND	ND	1 a 12	0 a 100	Não é afetado	Rocha, C. et al. (1992)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> GS1	Exopolissacarídeo	ND	ND	ND	ND	4 a 10	4 a 40	Superior a 50 g/l	Ashtaputre, A. A. e Shah, A. K. (1995)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan (complexo aniônico)	2,2 g/l (c)	ND	ND	ND	3,3 a 9,2	ND	ND	Navon Venezia, S. et al. (1995)

ND = Não determinado

(a) = precipitação ácida com HCl

(b) = octano/5 % NaCl-H₂O

(c) = precipitação com sulfato de amônio

3. MATERIAIS:

3.1. MICRORGANISMOS

No Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM)– FEA – UNICAMP – foram isoladas cepas bacterianas a partir de amostras de solo contaminado com hidrocarbonetos, coletados perto da refinaria de óleo de Paulínia – SP, produtoras de biosurfactantes comprovados em estudos realizados anteriormente (CARVALHO et al. – 1996, 1997, 1998). Três destas cepas, as que apresentaram maior atividade foram utilizadas neste estudo, para caracterização do biosurfactante.

Estas cepas foram previamente identificadas como mostra a tabela 3. Os testes bioquímicos realizados para a identificação das cepas estão apresentados no apêndice A (tabela A1).

TABELA 3: Descrição das cepas em estudo:

Cepa	Microrganismo	Isolamento	Gram	Aspecto
9	<i>Planococcus citreus</i>	Borra oleosa do solo	G+	Cultura rugosa, laranja. Coco.
BIA	<i>Pantoea agglomerans</i>	Borra oleosa do solo	G -	Cultura amarela, rugosa, bastonetes pequenos.
B3G	<i>Bacillus</i> sp	Borra oleosa do solo	G+	Cultura creme borda rugosa, bastonetes pequenos esporulado, com esporo terminal.

Em trabalhos realizados anteriormente *Planococcus citreus* apresentou maior atividade emulsificante quando cultivada em meio com 1,5 % de óleo de oliva, promovendo uma emulsão O/A (óleo/água, sendo que óleo, neste caso representa a fração insolúvel em água)

determinada por aumento de absorbância nos testes de emulsificação, como será descrito posteriormente. A cepa *Bacillus* sp por sua vez apresentou maior atividade emulsificante quando cultivada em meio com 1,5 % de óleo de soja, promovendo uma emulsão A/O (água/óleo) determinada pela produção de um halo estável nos testes de emulsificação. Já *Pantoea agglomerans* apresentou maior atividade emulsificante quando cultivada em meio com 1,5 % de querosene, promovendo também uma emulsão A/O (água/óleo) determinada pela produção de um halo estável nos testes de emulsificação. As figura 3 e 4 mostram as cepas 9 e B3G.

Cepa 9
Planococcus citreus



FIGURA 3: *Planococcus citreus* (cepa 9) inoculada em placa de Petri contendo GYP com 48 horas de incubação.

Cepa B3G
Bacillus sp



FIGURA 4: *Bacillus* sp (cepa B3G) inoculada em placa de Petri contendo NA com 48 horas de incubação.

3.2. MEIOS DE CULTURA:

3.2.1. Meio de cultura ágar nutriente (NA).

3.2.2. Meio formulado GYP.

Contendo (p/v):

- 2,0 % glicose
- 0,5 % extrato de levedura
- 1,0 % peptona
- 2,0 % ágar

3.2.3. Meio basal de produção do biosurfactante:

Constituído de (p/v):

- 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,3 % NaNO_3
- 0,1 % KH_2PO_4
- 0,1 % extrato de levedura
- 0,03 % peptona
- 1,5 % de fonte de carbono insolúvel em água

Fontes de carbono:

- Querosene
- Óleo de soja
- Óleo de oliva

4. MÉTODOS

4.1. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS:

As cepas foram mantidas em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado, sendo que para *Pantoea agglomerans* e *Bacillus* sp utilizou-se meio NA (ágar nutriente) e meio GYP para *Planococcus citreus*, sendo mantidas sob refrigeração a 16 °C, e transferidas para meio novo periodicamente.

Foram também mantidas culturas estoque em tubos “Nunc Cryo System” contendo 1 ml do meio de cultura adequado a cada cepa e 10 % de glicerol. Após inoculação das cepas e incubação a 30°C/72 h, os tubos foram congelados a -18 °C. Quando necessário, para a reativação celular, as cepas assim mantidas foram levemente aquecidas até liquefação do meio e a seguir transferidas para erlenmeyers de 125 ml contendo 20 ml de caldo nutriente e incubadas em agitador rotatório a 30 °C/150 rpm até crescimento satisfatório, seguindo-se inoculação em meio ágar inclinado adequado.

Precedendo a cada análise, as cepas foram repicadas para meio novo e incubadas à 30 °C por um período de 72 h (até obter-se um crescimento satisfatório) antes de serem inoculadas no meio basal de produção do biosurfactante.

4.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO E OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO LIVRE DE CÉLULAS (EBLC):

Em frascos erlenmeyers de 125 ml, contendo 75 ml do meio basal de produção do biosurfactante descrito no item 3.2.3 estéril, adicionou-se 1,5 % da fonte de carbono insolúvel em água (de acordo com a linhagem estudada), também estéril. Após inoculação da linhagem em questão (2 alçadas de 10 µl), os frascos foram incubados em agitador rotatório a 30 °C/150 rpm/48 h. Após o período de cultivo, o extrato bruto obtido foi centrifugado a 9.000 rpm/20 min/25 °C, sendo o sobrenadante filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, visando a eliminação completa de qualquer vestígio de óleo remanescente. O extrato assim obtido foi denominado EBLC (extrato bruto livre de

células) e mantido congelado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análises. Em alguns casos os frascos Erlenmeyer contendo o extrato bruto foi congelado com células à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ diretamente antes da centrifugação, mantendo-se condições estéreis até as análises serem efetuadas, sendo que após o descongelamento procedeu-se centrifugação e filtração do material (JAVAHERI et al. – 1985).

Para a produção de grandes quantidades de extrato bruto, o cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml do meio basal acrescido de 1,5 % da fonte de carbono insolúvel em água, inoculando-se 6 alçadas de 10 µl do microrganismo, procedendo-se a incubação em agitador rotatório a $30\text{ }^{\circ}\text{C}/150\text{ rpm}/48\text{ horas}$ e obtenção do EBLC como descrito acima.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO:

A medida da atividade de emulsificação foi efetuada conforme descrito por CARVALHO et al. (1996).

O caldo de cultura livre de células (extrato bruto livre de células-EBLC) foi obtido como descrito no item 4.2. Adicionou-se 2,0 ml de tolueno em tubo contendo 3,5 ml do extrato livre de células. A seguir agitou-se o tubo vigorosamente em vortex por 1 minuto e após repouso de 1 hora seguiu-se a medida da densidade óptica emulsão óleo/água a 610 nm (VON JOHNSON et al. – 1992), subtraindo-se o valor do branco, que foi obtido medindo-se a densidade óptica do meio de reação antes de se realizar a agitação em vortex. A densidade óptica obtida é descrita como a atividade de emulsificação.

Após 24 horas de repouso foi medido o halo da camada de emulsão (água/óleo), sendo a atividade expressa em centímetros (COOPER et al. – 1987 e BRODERICK et al. – 1981). Do método de inspeção visual foi feita a classificação em valores de 0 até +++++. A figura 5 ilustra como foi feita esta classificação visual. A determinação da densidade óptica (A_{610}), assim como a obtenção da medida do halo de emulsão aparecem representados na figura 6.

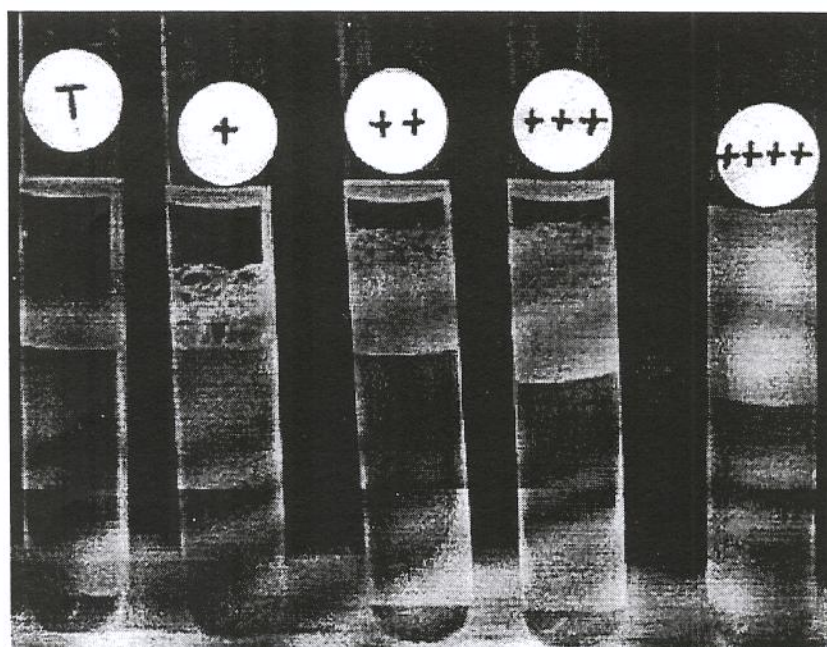


FIGURA 5: Classificação visual do halo da camada de emulsificação (água/óleo) em valores de 0 até +++++.
FONTE: FERRAREZZO - 1998.

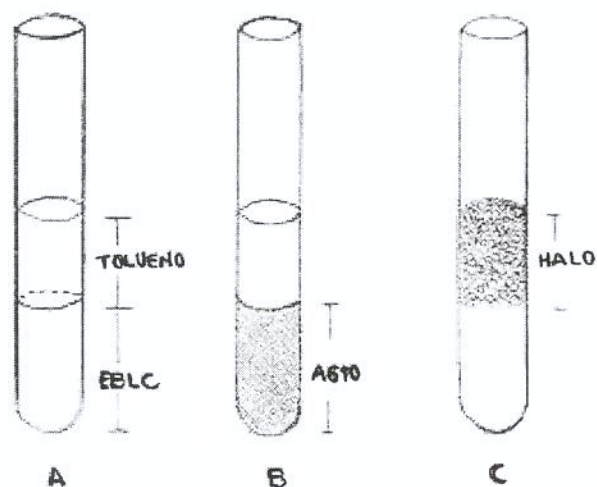


FIGURA 6: Obtenção de atividade de emulsificação através de atividade óptica (A_{610}) e halo de emulsificação (Halo (cm)). A = antes de vortex. B e C = após 1 minuto de vortex.

4.4. PARTICULARIDADES DAS CEPAS BACTERIANAS EM ESTUDO:

Planococcus citreus, *Bacillus* sp e *Pantoea agglomerans* foram cultivadas em diferentes tempos de incubação em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 75 ml do meio de sais e 1,5 % da fonte de carbono insolúvel, conforme descrito no item 4.2. A quantidade de inóculo neste caso foi de 2 alçadas de 10 μ l do microrganismo para cada Erlenmeyer. Os frascos foram incubados a 30 °C/150 rpm/ 1 a 5 dias.

4.5. PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO:

As cepas foram inoculadas (2 alçadas de 10 µl) em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 75 ml do meio basal para produção do biosurfactante e 1,5 % da fonte de carbono adequada para cada cepa, ou seja, óleo de soja para a cepa B3G e óleo de oliva para a cepa 9.

Foram incubadas em agitador rotatório a:

- 30 °C/48 h/150 rpm
- 40 °C/48 h/150 rpm
- 50 °C/48 h/150 rpm

Os frascos Erlenmeyer foram retirados do agitador rotatório e o extrato bruto foi centrifugado 9.000 rpm/20'/25 °C. O sobrenadante denominado extrato bruto livre de células (EBLC) foi conservado a - 18 °C para posterior análise.

O EBLC assim obtido foi analisado quanto a capacidade de emulsificação como descrito no item 4.3.

4.6. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE DO EBLC:

Alíquotas de 10 ml do EBLC (item 4.2) foram incubadas em banho-Maria a diferentes temperaturas (16 a 100 °C) por 1 hora em tubos com rosca, sendo a seguir resfriadas a temperatura ambiente antes da medida da atividade de emulsificação. Alíquotas de 3,5 ml do EBLC submetido a estes tratamentos térmicos, foram analisadas quanto a capacidade de emulsificação como descrito no item 4.3, sendo a atividade do biosurfactante descrita como absorbância a 610 nm (A_{610}) para *Planococcus citreus* e formação de halo (cm) para *Bacillus* sp.

4.7. INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DO BIOSURFACTANTE DO EBLC:

Alíquotas de 10 ml do EBLC (item 4.2) foram transferidas para béquer e o pH do meio foi previamente ajustado com HCl ou NaOH, conforme o pH desejado (2,0 a 11,0), medido com auxílio de potenciômetro. A seguir 3,5 ml do EBLC sujeito a este ajuste de pH foi colocado em tubos de análise, procedendo-se a determinação da atividade emulsificante conforme descrito no item 4.3.

4.8. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SAL NaCl NA ATIVIDADE DO BIOSURFACTANTE DO EBLC:

Para avaliar a estabilidade do biosurfactante a sais determinou-se a capacidade de emulsificação do extrato bruto livre de células (item 4.2), tomando-se 3,5 ml em tubos de análise seguido da adição de NaCl nas seguintes concentrações 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 % (p/v). Os tubos foram agitados em vortex até completa dissolução do sal. A seguir adicionou-se 2,0 ml de tolueno e após leitura de absorbância (branco) agitou-se novamente os tubos por 1 minuto. A medida da atividade foi efetuada como descrito anteriormente no item 4.3.

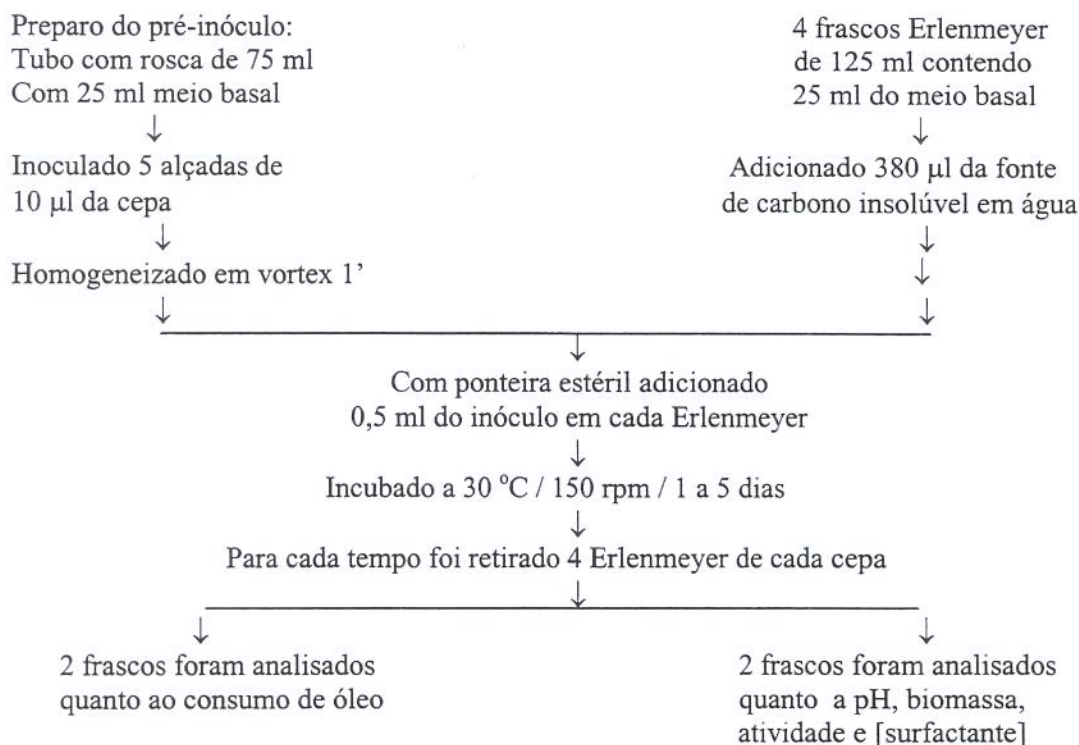
4.9. ESTUDO DA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO:

Foram preparadas quadruplicatas do meio de cultivo em frascos Erlenmeyer de 100 ml contendo 25 ml do meio basal de sais e 1,5 % da fonte de carbono insolúvel em água para cada tempo testado, aos quais foi adicionado um inóculo da cultura, preparado da seguinte forma: em um tubo com rosca de 70 ml contendo 25 ml do meio basal de sais

estéril sem a fonte de carbono, foram inoculadas 5 alçadas de 10 µl da cultura do microrganismo (cultura de 72 horas incubada a 30 °C em ágar inclinado adequado para cada cepa), e em seguida foi agitado vigorosamente em vortex por 1 minuto para perfeita homogeneização. A quantidade de inóculo adicionado a cada frasco Erlenmeyer consistiu de 0,5 ml, utilizando-se pipetador automático. Este procedimento visou principalmente a tentativa de se adicionar em cada Erlenmeyer quantidades iniciais do microrganismo de forma reprodutível, já que a utilização de alças de inoculação diretamente com o microrganismo poderia incorrer em diferenças de inóculo. A seguir todos os frascos Erlenmeyer foram incubados em agitador rotatório a 30 °C/150 rpm pelo período de 1 a 5 dias. Após cada período de incubação foram retiradas as quadruplicatas que imediatamente foram congeladas a -18 °C, sem qualquer tipo de tratamento, ou seja centrifugação ou filtração, mantendo-se as condições estéreis. Dois dos frascos Erlenmeyer foram utilizados para quantificação do consumo de óleo e os dois restantes para as demais análises. A Figura 7 exemplifica o processo.

Os frascos Erlenmeyer destinados as análises de biomassa, pH, atividade e concentração de surfactante foram descongelados e os caldos de cultura foram centrifugados a 9.000 rpm/20 min/25 °C. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, visando eliminar ao máximo resíduos de óleo (**SAMPAIO – 1995**), sendo denominado extrato bruto livre de células (EBLC). A massa celular foi analisada como descrito no item 4.9.1.

FIGURA 7: Análise da produção de biosurfactante:



4.9.1. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA:

4.9.1.1. Cepa B3G:

Para *Bacillus* sp o precipitado obtido como descrito no item 4.9 foi lavado com 25 ml de hexana e transferido para tubos menores de centrifuga tarados, tomando-se o máximo cuidado para não transferir resíduos de óleo e centrifugado a 9.000 rpm/20 min/25 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi novamente lavado e centrifugado. O precipitado final foi então seco em estufa até peso constante. A biomassa foi determinada como peso seco (g/ml) por diferença de pesos.

4.9.1.2. Cepa 9:

A massa celular de *Planococcus citreus* quando centrifugado não formou um precipitado no fundo do tubo, mas permaneceu como uma nata cremosa na superfície do meio, o que dificultou sua quantificação, havendo a necessidade de alterações no procedimento.

Após centrifugação, o caldo de cultura foi filtrado em papel de filtro tarado, tomando-se o máximo de cuidado para que a menor quantidade de células passassem para o filtro. Após coleta do EBLC, o papel de filtro foi lavado 2 vezes com hexana para eliminar os resíduos de óleo e seco até peso constante, obtendo-se por diferença de peso a biomassa designada como m1.

O restante da massa celular que permaneceu nos tubos foi lavado 2 vezes com 25 ml hexana e centrifugada cada vez a 9.000 rpm/20 min/25 °C. O sobrenadante com óleo foi desprezado e a massa celular foi transferida para frascos tarados e seca em estufa até peso constante, obtendo-se por diferença de peso a biomassa designada como m2. A biomassa foi determinada como peso seco (g/ml) pela soma dos valores obtidos de m1 e m2.

4.9.2. DETERMINAÇÃO DO pH DO EBLC:

O pH das amostras dos extratos brutos livres de células (EBLC) foi determinado diretamente utilizando-se potenciômetro.

4.9.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO:

A atividade de emulsificação foi determinada como previamente descrito no item 4.3.

4.9.4. DETERMINAÇÃO DO ÓLEO RESIDUAL

Para a quantificação do óleo residual foram utilizados dois frascos Erlenmeyer com o meio de cultivo sem qualquer tratamento como centrifugação ou filtração.

Foi utilizada a metodologia de quantificação de óleos desenvolvida por **BLIGH E DYER (1959)**, que é o método de quantificação para óleos mais aceito, utilizado principalmente para alimentos. Foi feita uma adaptação para a quantificação do óleo residual do meio de cultivo, designado como EB (extrato bruto), mantendo-se, no entanto as proporções descritas no método entre os solventes clorofórmio/metanol/EB. O método consiste em duas extrações sucessivas sendo que na primeira, a proporção entre os solventes e o EB é de 1:2:0,8 e na segunda de 2:2:1,8. A Figura 8 descreve o método.

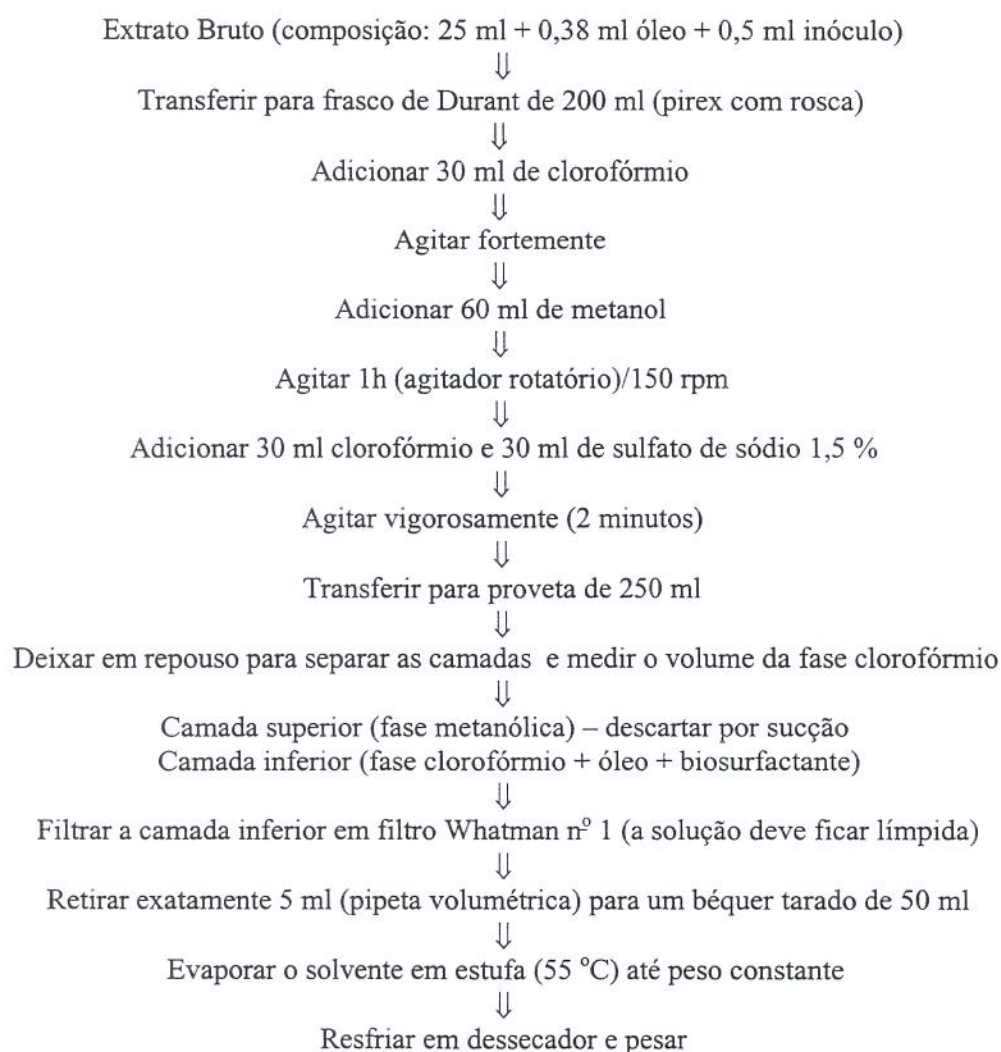
Considerando-se que todo o óleo é extraído e permanece na fase clorofórmio, é importante saber exatamente a quantidade de fase clorofórmio obtida, pois assim é feita uma relação entre a quantidade de óleo na alíquota de 5 ml e a fase total.

Por este método não se consegue quantificar massa celular, pois ela fica totalmente dissolvida no solvente, sendo que mesmo após a centrifugação não há formação de precipitado.

O objetivo em se adicionar sulfato de sódio 1,5 % consiste em quebrar a emulsão que tenha se formado no caldo de cultura com o óleo (já que há a presença do biosurfactante). Testes realizados com a adição de maiores quantidades de sal não incorreu em diferenças significativas na quantificação do óleo (dados não mostrados).

Uma observação interessante é que a utilização de clorofórmio/metanol é um dos métodos clássicos de extração de biosurfactantes descrito na literatura (**ROCHA et al. (1992), CIRIGLIANO e CARMAN (1985)**). Portanto a quantificação do biosurfactante foi feita pelo mesmo procedimento utilizando o EBLC, sendo ao final este valor subtraído do valor obtido nesta etapa, resultando assim na quantidade de óleo não consumido pelo microrganismo. O procedimento foi o mesmo para ambas as cepas.

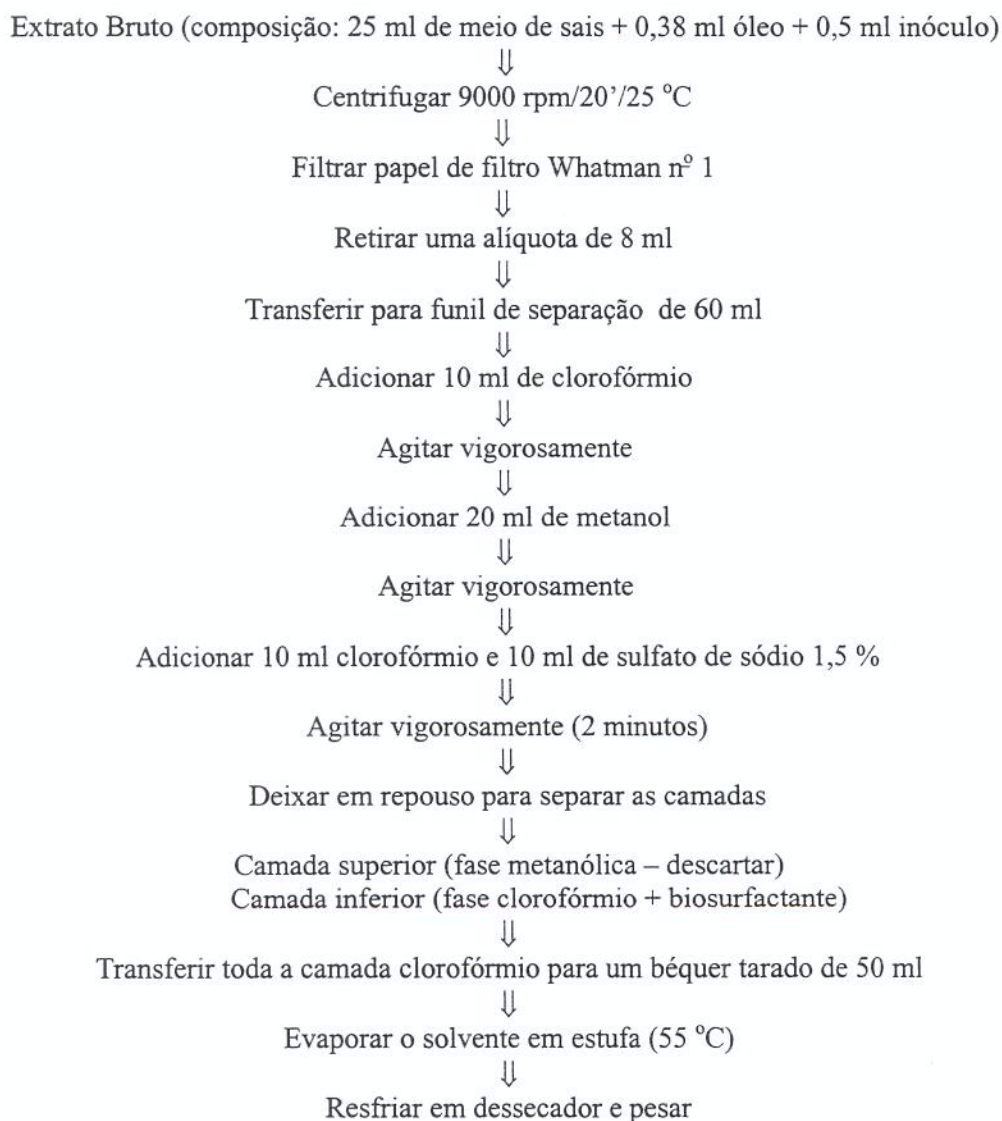
FIGURA 8: Quantificação do óleo residual –metodologia de BLIGH e DYER:



4.9.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOSURFAC-TANTE

A quantidade de biosurfactante no EBLC obtido como descrito no item 4.9, livre de óleo através da filtração em papel de filtro Whatman nº 1, foi determinada pelo método de **BLIGH E DYER (1959)** como ilustrado na Figura 9.

FIGURA 9: Quantificação do biosurfactante –metodologia de **BLIGH E DYER:**



4.10. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO INSOLÚVEL NA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE:

Planococcus citreus e *Bacillus* sp foram cultivados em diferentes tempos de incubação em erlenmeyers de 125 ml contendo 75 ml do meio de sais + 1,5 % de querosene como fonte de carbono insolúvel (item 4.2). A quantidade de inóculo utilizada foi de 1,5 ml preparado conforme descrito no item 4.8.

4.11. TESTE CTAB (BROMETO DE CETIL TRIMETIL AMÔNIO):

O método de detecção de biosurfactantes aniônicos extracelulares desenvolvido por **SIEGMUND e WAGNER (1991)** foi utilizado para as cepas em estudo.

Os microrganismos foram inoculados em placas de Petri contendo o seguinte meio:

Meio de sais minerais:

pH final 6,7.

20 g	glicose
0,7 g	KH ₂ PO ₄
0,9 g	Na ₂ HPO ₄
2,0 g	NaNO ₃
0,4 g	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,1 g	CaCl ₂ .2H ₂ O
2,0 ml	Solução A (descrita abaixo)
H ₂ O destilada qsp 1.000 ml	

Solução A:

2 g	FeSO ₄ .7H ₂ O
1,5 g	MnSO ₄ .H ₂ O
0,6 g	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄
H ₂ O destilada qsp 1.000 ml	

CTAB - azul de metileno:

0,2 g	CTAB
0,005g	Azul de metileno
15 g	Ágar
Meio de sais minerais qsp 1.000 ml	

Após inoculação as placas foram incubadas a 30 °C, sendo feita inspeção periódica.

4.12. PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DO BIOSURFACTANTE:

Para a produção de grandes quantidades de EBLC foram utilizados vários frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 300 ml do meio de sais e 1,5 % da fonte de carbono como descrito no item 4.2, sendo a seguir as frações combinadas.

Após obtenção do EBLC o biosurfactante foi extraído por tentativas, utilizando-se metodologias descritas na literatura.

4.12.1. Cepa 9:

Para *Planococcus citreus* foi realizada extração com clorofórmio/ metanol.

O EBLC foi transferido para funil de separação e a seguir adicionado clorofórmio. Agitou-se vigorosamente por 5 minutos. Em seguida adicionou-se o metanol e novamente agitou-se vigorosamente 5 minutos. O material foi deixado em repouso para separação das fases. A proporção entre as fases foi de clorofórmio/metanol/EBLC (2:1:3).

A fase inferior clorofórmio foi coletada em frasco tarado e a evaporada com o auxílio de rotoevaporador. O extrato foi congelado, seguido de liofilização por uma noite e pesado para cálculo do

rendimento. Fez-se análise da capacidade de emulsificação (item 4.3) do EBLC e do extrato liofilizado.

4.12.2. Cepa B3G:

Para *Bacillus* sp foram realizadas três tentativas diferentes de extração do biosurfactante: por acidificação do meio, com clorofórmio/metanol e com clorofórmio.

4.12.2.1. Extração com HCl:

Muitos autores, no estudo de várias espécies de *Bacillus*, têm citado a extração de biosurfactantes através da acidificação do meio de cultivo com HCl (JAVAHERI et al. (1985), HOROWITZ et al. (1990), JENNY et al. (1991), VAN DYKE et al. (1993), YAKIMOV et al. (1995)).

Ao EBLC de *Bacillus* sp foi adicionado HCl 37 % até atingir pH 2,0, determinado com auxílio de potenciômetro. A seguir o meio foi deixado em repouso por 24 h a 4 °C.

Após este período obteve-se um precipitado branco. O meio foi submetido a centrifugação 9.000 rpm/20 min/25 °C em frascos tarados. O precipitado foi cuidadosamente separado do sobrenadante e a seguir congelado para posterior liofilização. O precipitado obtido foi então liofilizado por uma noite seguido de pesagem para obtenção do rendimento e guardado em dessecador para posterior análise.

Realizou-se a análise da atividade de emulsificação para o EBLC antes de ser submetido a acidificação, para o extrato liofilizado e para o sobrenadante obtido após centrifugação do meio acidificado.

4.12.2.2. Extração com clorofórmio/metanol (2:1:3):

A extração do biosurfactante de *Bacillus* sp também foi realizada conforme descrito no item 4.12.1. A atividade de emulsificação foi determinada para o EBLC e extrato liofilizado.

4.12.2.3. Extração com clorofórmio (2:3):

A extração do biosurfactante de *Bacillus* sp também foi realizada conforme descrito no item 4.12.1, excetuando-se a adição de metanol. Foi determinada a capacidade de emulsificação para o EBLC e para o extrato liofilizado.

4.13. ANÁLISE DO EXTRATO LIOFILIZADO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA:

Os extratos liofilizados obtidos de *Planococcus citreus* por extração com clorofórmio/metanol/EBLC e de *Bacillus* sp por extração com clorofórmio/EBLC foram analisados por cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas de sílica gel G.

Os extratos de *Planococcus citreus* e *Bacillus* sp foram dissolvidos em metanol e em clorofórmio a uma concentração de 25 mg/ml e 15 mg/ml respectivamente. Cerca de 10 µl de cada amostra foram aplicadas em placa. Utilizaram-se como padrões óleo de oliva, óleo de soja, mistura de aminoácidos, mistura de açúcares (glicose e sacarose).

O sistema de solventes utilizado foi clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio 28 % (65:25:4), como descrito por **HOROWITZ et al. (1990)**.

As manchas foram visualizadas por borrifamento das placas com:

- Rodamina 6 G (0,005 % em em água destilada) e visualização sob lâmpada UV (**DITTMER E LESTER (1964)**).
- Ninidrina (0,2 % em acetona) e visualização após aquecimento das placas a 100 °C por 5 minutos (**DITTMER E LESTER (1964)**).
- Ácido sulfúrico e visualização após aquecimento a 100°C (**HOROWITZ et al. (1990)**).

Os agentes reveladores foram aplicados na mesma placa, nesta ordem, sucessivamente objetivando obter o máximo de informações a partir de uma mesma placa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. PARTICULARIDADES DAS CEPAS BACTERIANAS EM ESTUDO:

Através de estudos realizados anteriormente no LSFM, determinou-se que as cepas 9 (*Planococcus citreus*), B3G (*Bacillus* sp) e B1A (*Pantoea agglomerans*) apresentam maior atividade emulsificante quando são incubadas com 1,5 % de óleo de oliva, óleo de soja e querosene, respectivamente.

Planococcus citreus apresentou-se com capacidade de produzir emulsão O/A (óleo/água), sendo que neste caso o termo “óleo” refere-se a fração tolueno, determinada pelo aumento na absorbância nos testes de emulsificação.

Bacillus sp apresentou-se com capacidade de produzir emulsão A/O, determinado pelo mesmo teste de emulsificação, através da produção de halo estável (++++).

Da mesma forma *Pantoea agglomerans* também apresentou a capacidade de produzir emulsão estável A/O, pela produção de halo (++++). No entanto um fato diferente foi detectado durante os procedimentos laboratoriais (CARVALHO – dados não publicados). Os estudos até então efetivados mostraram esta característica da cepa *Pantoea agglomerans*, que foi comprovado conforme os resultados obtidos durante este trabalho e mostrados na Figura 10 e Tabela B1 (Apêndice B).

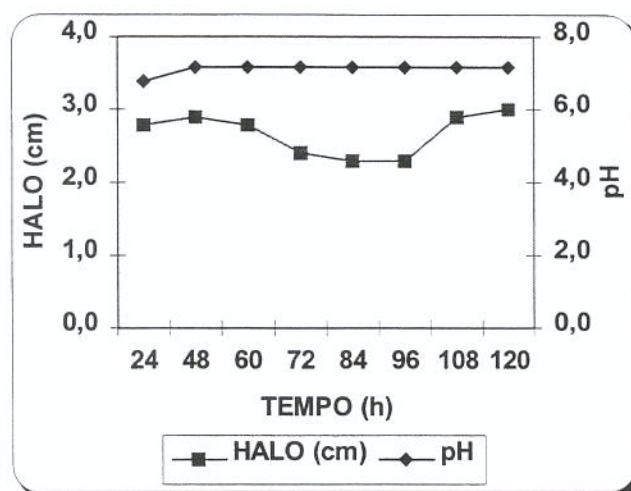


FIGURA 10: Atividade de emulsificação e pH do meio de cultura contendo 1,5 % de querosene inoculado com *Pantoea agglomerans* em diferentes tempos de cultivo.

Após a realização de novos testes a referida cepa deixou de apresentar a mesma capacidade emulsificante, ou seja, deixou de apresentar a formação de halo. Através de análises de dados e procedimentos, notou-se que quando houve a formação de halo (++++) ocorreu uma pequena diferença no procedimento, sendo que neste caso os frascos Erlenmeyer eram retirados do agitador rotatório após o período de incubação e congelados imediatamente sem qualquer tratamento prévio do extrato bruto, tais como centrifugação ou filtração, para análises posteriores. Quando os respectivos frascos Erlenmeyer eram retirados do agitador rotatório e imediatamente centrifugados e filtrados em papel Whatman nº 1, eliminando-se as células presentes, o extrato bruto livre de células não apresentava qualquer atividade de emulsificação. Chegou-se a conclusão que este fato interferia de alguma

forma na obtenção do biosurfactante da cepa B1A. O mesmo fato não foi notado com as demais cepas, o que leva a sugerir a hipótese de *Pantoea agglomerans* produzir biosurfactante ligado a parede celular e o congelamento e descongelamento das células deva levar a lise da parede celular, provavelmente pelo fato do congelamento ser feito de uma forma lenta, o que leva a formação de cristais grandes de gelo, que levam ao rompimento da parede celular. Para comprovar este fato, fez-se um teste, no qual era realizado o cultivo do microrganismo em querosene, conforme descrito no item 4.2 e a seguir um frasco Erlenmeyer foi imediatamente centrifugado e filtrado obtendo-se assim o EBLC e realizado o teste de emulsificação, e no segundo Erlenmeyer foi realizado o teste de emulsificação tomando-se a alíquota de 3,5 ml do caldo de cultivo sem qualquer tipo de tratamento (centrifugação, filtração ou congelamento). No primeiro caso não obteve-se a formação do halo e no segundo (contendo células) houve a formação de um halo estável por vários dias. Devido a este fato inusitado o estudo das propriedades do biosurfactante produzido por esta cepa não foi levado adiante, ficando desta forma em aberto a análise desta característica para trabalhos futuros, desde que o presente tem por objetivo o estudo de biosurfactantes produzido extracelularmente.

O efeito do tempo de fermentação na produção do biosurfactante e alteração do pH do meio de cultivo para *Planococcus citreus* são apresentados na Figura 11 e Tabela B2 (apêndice B) e para *Bacillus* sp na Figura 12 e Tabela B3 (Apêndice B).

Planococcus citreus começa a ter uma alta atividade em tempos superiores a 60 horas de incubação. Em 72 a 108 horas os valores decaem, ocorrendo oscilações, voltando novamente a uma maior atividade em 120 horas de incubação. Possivelmente esta oscilação possa ser devido a consumo do biosurfactante produzido pela bactéria, preferencialmente ao óleo de oliva. Fato semelhante já foi observado por **SAMPAIO (1995)**. Podemos observar que não houve a formação de halo de emulsão, conforme descrito anteriormente.

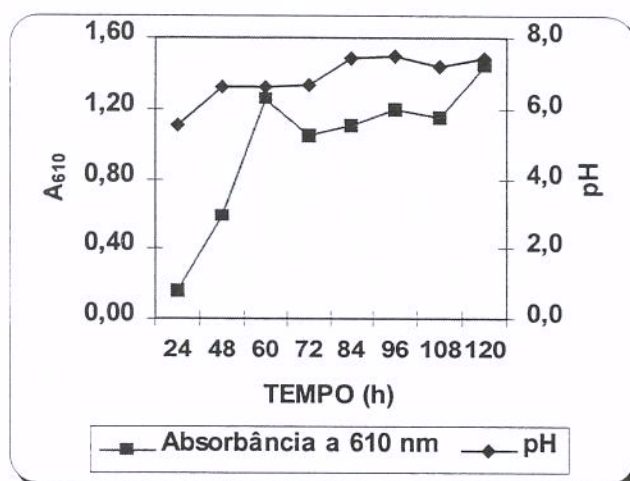


FIGURA 11: Atividade de emulsificação e pH do meio de cultura contendo 1,5 % de óleo de oliva inoculado com *Planococcus citreus* em diferentes tempos de cultivo.

Observou-se que *Bacillus* sp produziu biosurfactante após 24 horas de crescimento a 30 °C. A capacidade de emulsificação determinada pela medida do halo de emulsão e aspecto de emulsão intenso (+++++) foi considerável até 120 horas de crescimento.

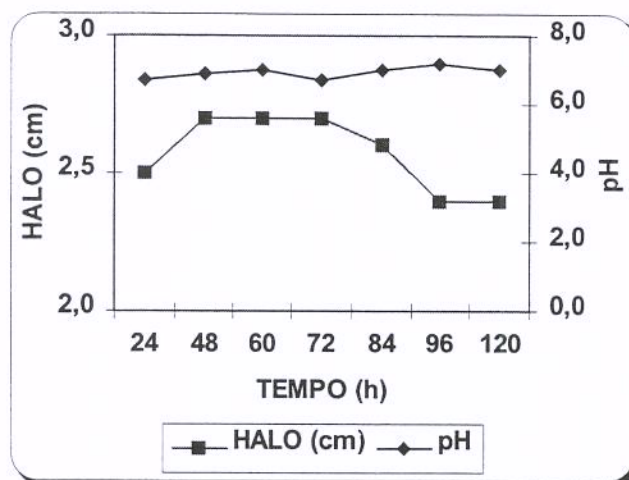


FIGURA 12: Atividade de emulsificação e pH do meio de cultura contendo 1,5 % de óleo de soja inoculado com *Bacillus* sp em diferentes tempos de cultivo.

5.2. PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE CULTIVO:

5.2.1. Cepa 9:

De acordo com os testes de emulsificação, no crescimento da cepa *Planococcus citreus* a 30 °C e 40 °C a atividade de emulsificação determinada pela medida da densidade óptica foi alta, atingindo os valores de 1,29 e 1,30, respectivamente. A 50 °C a produção de biosurfactante foi baixa. Os resultados são apresentados na Figura 13 e Tabela B4 (apêndice B).

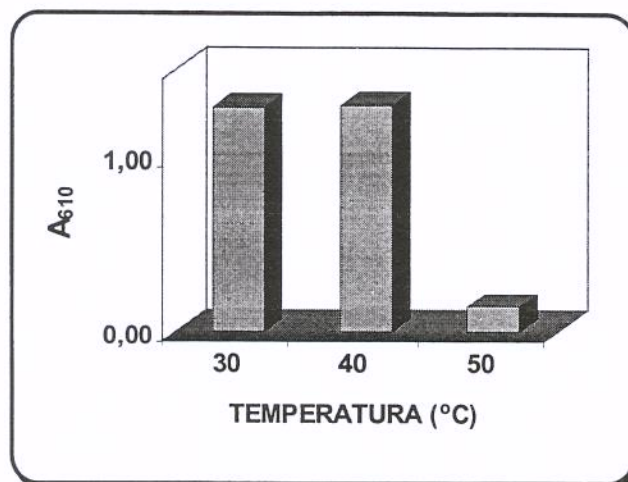


FIGURA 13: Efeito da temperatura de cultivo na produção de biosurfactante pela cepa *Planococcus citreus*.

Planococcus citreus produz uma massa celular de coloração laranja, como peletes, sendo que após centrifugação não há formação de células precipitadas mas sim, as mesmas permanecem na superfície do meio líquido quando incubada a 30 e 40 °C. Quando, porém, incubada a 50 °C apesar de também não haver a formação de precipitado, as células perdem sua coloração laranja característica, tornando-se esbranquiçadas.

5.2.2. Cepa B3G:

Bacillus sp quando cultivada a 30 °C apresenta uma excelente capacidade de emulsificação, produzindo halo (++++) estável por vários dias. Quando, no entanto, cultivada a 40 e 50 °C a cepa perde sua capacidade de produzir o biosurfactante. Os resultados são apresentados na Figura 14 e Tabela B4 (apêndice B).

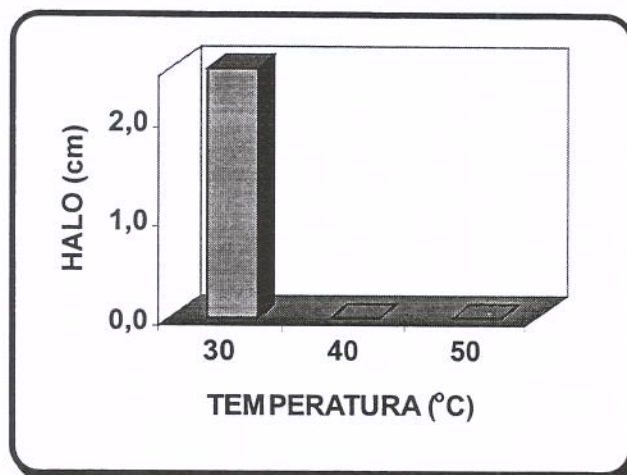


FIGURA 14: Efeito da temperatura de cultivo na produção de biosurfactante pela cepa *Bacillus* sp.

5.3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE DO EBLC:

5.3.1. Cepa 9:

A emulsão produzida pelo biosurfactante de *Planococcus citreus* mostrou-se estável após 1 hora de incubação do EBLC, com ótima capacidade de emulsificação em todas as temperaturas testadas, como pode ser observado pelos valores de A_{610} através da Figura 15 e Tabela B5 (apêndice B).

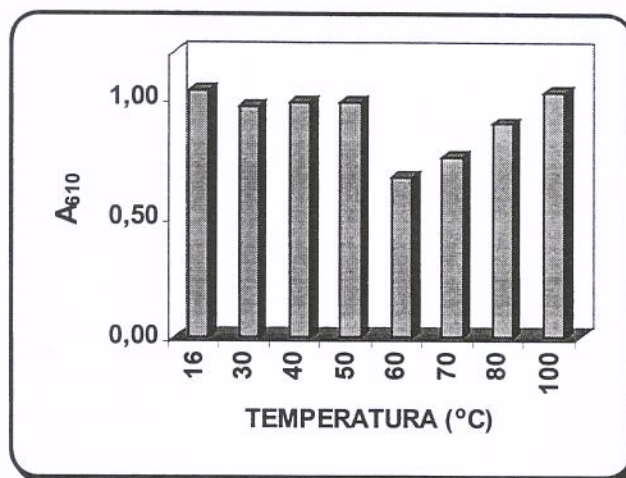


FIGURA 15: Efeito da temperatura na estabilidade do biosurfactante produzido por *Planococcus citreus*.

Foi observado diminuição da atividade de emulsificação, determinada pela medida de densidade óptica a 610 nm, após 1 hora de tratamento térmico do EBLC a 60 °C e 70 °C. Aparentemente não há motivo óbvio para este fato, desde que o tratamento a 100 °C não resultou em diminuição da atividade de emulsificação.

5.3.2. Cepa B3G:

Em todas as temperaturas testadas o biosurfactante produzido por *Bacillus* sp apresentou-se estável após 1 hora de incubação tendo excelente capacidade de emulsificação, sempre produzindo halo intenso (+++++) e estável por vários dias. Em temperaturas acima de 50 °C a altura do halo apresentou-se maior que a temperaturas inferiores. Os resultados são apresentados na Figura 16 e Tabela B5 (Apêndice B).

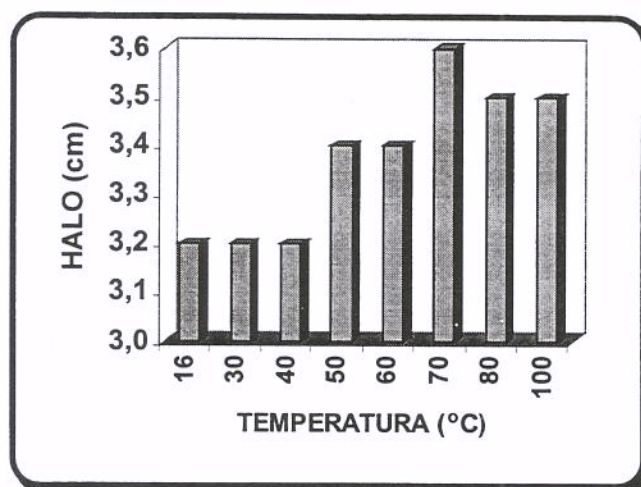


FIGURA 16: Efeito da temperatura na estabilidade do biosurfactante de *Bacillus* sp.

5.4. INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DO BIOSURFACTANTE DO EBLC:

5.4.1. Cepa 9:

O biosurfactante apresentou maior atividade de emulsificação na faixa que varia da neutralidade a alcalinidade. Em pH 2,2 a 3,2 a atividade de emulsificação foi baixa.

O pH inicial do EBLC para *Planococcus citreus* foi 6,5. O efeito do pH na atividade do biosurfactante está ilustrado na Figura 17 e Tabela B6 (Apêndice B).

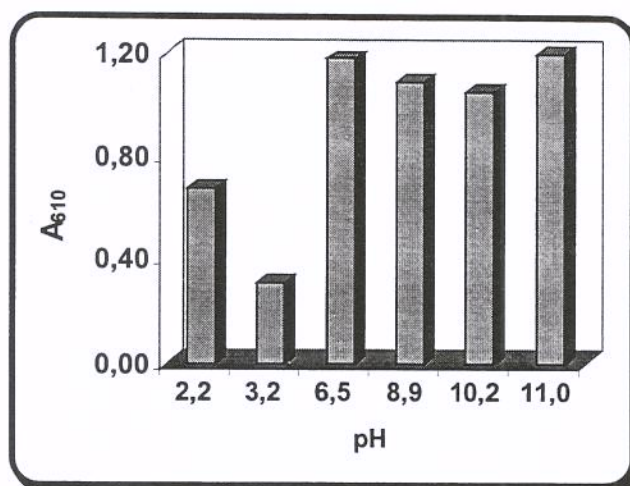


FIGURA 17: Efeito do pH na atividade do biosurfactante de *Planococcus citreus*.

5.4.2. Cepa B3G:

O pH inicial do EBLC para *Bacillus* sp foi 6,5. Os resultados estão ilustrados na Figura 18 e Tabela B7 (Apêndice B).

Durante o experimento observou-se que na faixa ácida ocorria floculação do EBLC, porém os testes de atividade foram executados normalmente. Observa-se que nesta faixa não ocorre a formação de emulsão determinada pela formação de halo. Este fato está de acordo com dados obtidos nos testes para extração do biosurfactante com adição de HCl, como será mostrado posteriormente. Sabe-se que o abaixamento do pH do extrato bruto para extração de biosurfactantes levando-o a precipitação, seguido de centrifugação é um método bastante citado na literatura. Observa-se no entanto que o biosurfactante produzido pela cepa B3G perde sua capacidade de produzir emulsão em valores de pH ácidos, porém em valores que variam da neutralidade a pH alcalino a capacidade de formar halo intenso (+++++) e estável por

vários dias é excelente. Existe portanto a possibilidade de que em pH ácido a perda de atividade seja não somente pela precipitação, mas talvez uma hidrólise ocorra no biosurfactante, pois como será mostrado no item 5.9.2.1 não há atividade no extrato obtido por precipitação ácida.

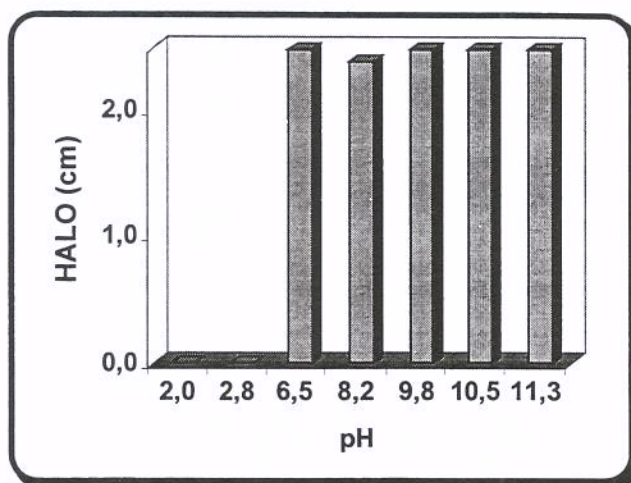


FIGURA 18: Efeito do pH sobre na atividade do biosurfactante de *Bacillus* sp.

5.5. INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SAL NaCl NA ATIVIDADE DO BIOSURFACTANTE DO EBLC:

5.5.1. Cepa 9:

A adição de 5 a 25 % de NaCl no EBLC de *Planococcus citreus* diminuiu ligeiramente a atividade do biosurfactante, determinada pela absorbância a 610 nm (A_{610}), porém ainda assim apresentando valores muito bons quanto a capacidade de emulsificação. A adição de 30 % de NaCl no EBLC diminuiu cerca de 70 % a atividade de emulsificação. A Figura 19 e Tabela B8 (Apêndice B) ilustram os resultados.

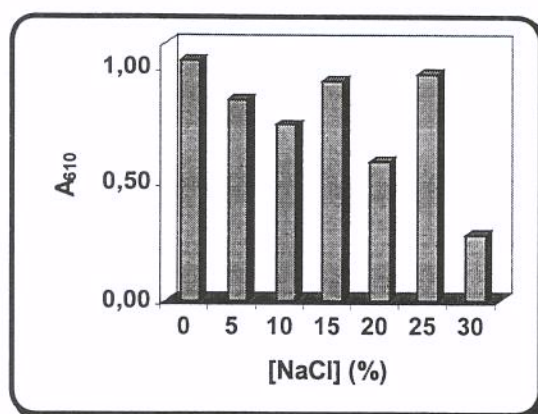


FIGURA 19: Efeito da concentração de sal NaCl na atividade do biosurfactante de *Planococcus citreus*.

5.5.2. Cepa B3G:

A adição de NaCl (5 a 30 %) no EBLC de *Bacillus* sp não afetou a atividade de emulsificação, tendo-se obtido halo intenso (++++) estável por vários dias. Os resultados são apresentados na Figura 20 e Tabela B8 (Apêndice B).

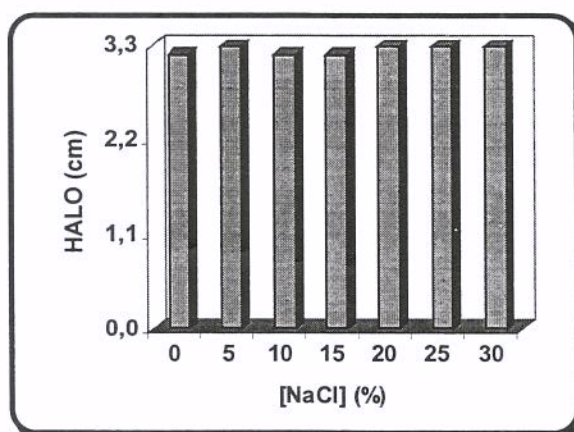


FIGURA 20: Efeito da concentração de sal NaCl na atividade do biosurfactante de *Bacillus* sp.

5.6. ESTUDO DA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO:

5.6.1. Cepa 9

O efeito do tempo de cultivo na produção de biosurfactante pela linhagem *Planococcus citreus* (9) estão apresentados na Figura 21 e Tabela B9 (Apêndice B).

De acordo com os resultados mostrados no item 5.1 (Figura 11), cuja adição do inóculo foi realizada por adição de 2 alçadas da cultura de *Planococcus citreus* diretamente no meio de cultura e os resultados apresentados na Figura 21, cuja adição do microrganismo foi efetuada através de um pré inóculo, conforme descrito no item 4.9, podemos verificar a influência do inóculo adicionado. Neste segundo caso somente ocorreu aumento significativo na atividade em 5 dias de crescimento, onde também a quantidade de biomassa era claramente visível. Possivelmente *Planococcus citreus* ainda encontre-se na fase lag de crescimento neste segundo estudo, sendo que a produção do biosurfactante ainda não foi suficiente para levar a valores consideráveis de atividade emulsificante. Com a inoculação do microrganismo diretamente, em 60 horas de crescimento a atividade já apresentava valores altos.

Podemos notar em ambos os casos um ligeiro aumento nos valores de pH em 4 dias de incubação.

Nota-se também o consumo do óleo de oliva durante o crescimento, além da produção do biosurfactante, demonstrando sua utilização pelo microrganismo para crescimento. Novamente chama a atenção o fato de haver uma queda nos valores de concentração do

biosurfactante tendo um decréscimo entre dois e três dias, voltando novamente a aumentar, evidenciado pelo aumento da atividade em 5 dias de crescimento.

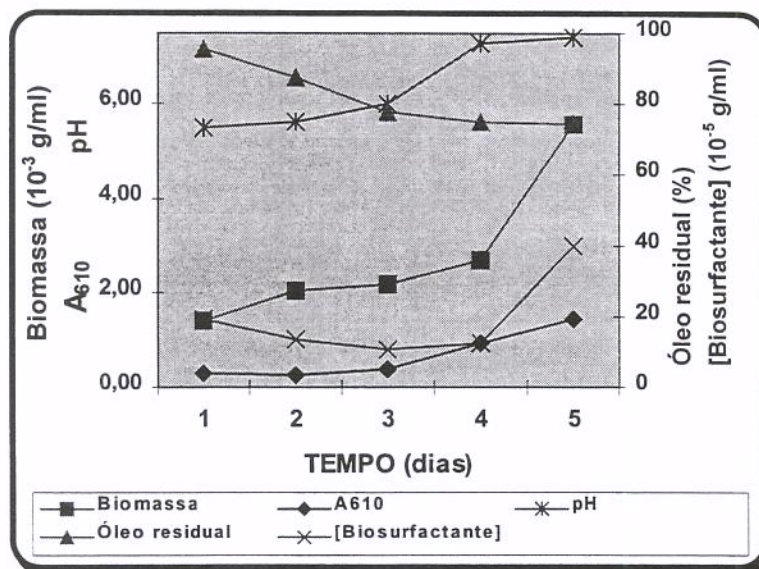


FIGURA 21: Efeito do tempo de cultivo na produção de biosurfactante, pela linhagem *Planococcus citreus* em meio contendo 1,5 % de óleo de oliva.

5.6.2. Cepa B3G:

O efeito do tempo de cultivo na produção de biosurfactante pela linhagem *Bacillus* sp (B3G) estão apresentados nas Figuras 22 e 23 e Tabela B10 (Apêndice B).

Pelas Figuras 12 e 22 nota-se que a forma de adição do inóculo não alterou a capacidade da cepa em produzir o biosurfactante, sendo que em ambos os casos *Bacillus* sp apresentou excelente capacidade de emulsificação. Neste segundo caso pode ser observado que a concentração do biosurfactante e capacidade de emulsificação praticamente permanecem constantes. Podemos também observar que

mesmo um pequeno consumo de óleo de soja já é suficiente para promover a produção do biosurfactante.

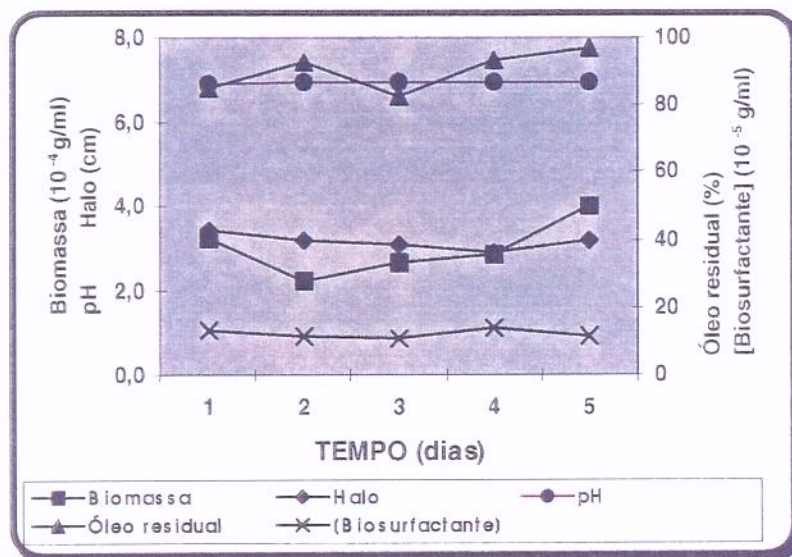
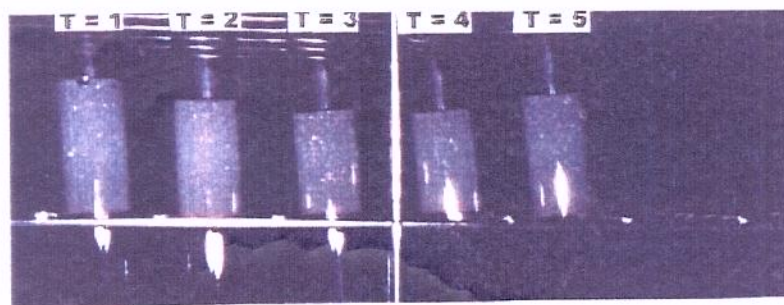


FIGURA 22: Efeito do tempo de cultivo na produção de biosurfactante pela linhagem *Bacillus* sp em meio contendo 1,5 % de óleo de soja.



B3G - *Bacillus* sp

Condições de crescimento: incubação a 30 °C / 150 rpm / 1 a 5 dias.

Meio de crescimento: meio basal + 1,5 % óleo de soja.

FIGURA 23: Halo de emulsão estabilizado por biosurfactante produzido por *Bacillus* sp em diversos tempos de cultivo em meio de cultura contendo 1,5 % de óleo de soja.

5.7. INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO NA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE:

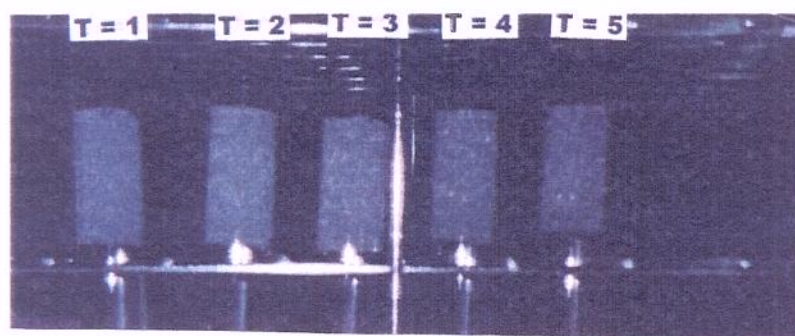
Planococcus citreus quando inoculado em meio de cultura contendo querosene como fonte de carbono, não produziu biosurfactante de forma significativa.

A linhagem *Bacillus* sp produziu biosurfactante após 24 horas de incubação em meio de cultura contendo querosene como fonte de carbono. A atividade de emulsificação, determinada pela formação de halo, permaneceu alta até 5 dias de incubação, sempre com obtenção de halo (++++). A Tabela 4 e Figura 24 ilustram os resultados.

TABELA 4: Halo de emulsão estabilizado por biosurfactante produzido por *Bacillus* sp em diversos tempos de cultivo em meio de cultura contendo 1,5 % de querosene.

Tempo (dias)	Halo de emulsão (cm)	Aspecto da emulsão	PH do meio
1	2,9	++++	6,8
2	2,9	++++	7,0
3	3,0	++++	7,1
4	3,0	++++	7,1
5	2,4	++++	7,1

Os resultados são apresentados como média de duplicatas.



B3G - *Bacillus* sp

**Condições de crescimento: incubação a 30 °C / 150 rpm /
1 a 5 dias.**

Meio de crescimento: meio basal + 1,5 % querosene.

FIGURA 24: Halo de emulsão estabilizado por biosurfactante produzido por *Bacillus* sp em diversos tempos de cultivo em meio de cultura contendo 1,5 % de querosene.

5.7. TESTE CTAB (BROMETO DE CETIL TRIMETIL AMÔNIO):

Planococcus citreus (9) e *Bacillus* sp (B3G) cresceram nas placas de Petri contendo o meio para detecção de biosurfactantes iônicos, porém não houve a formação de qualquer halo em torno das colônias. Ambos adquiriram uma coloração azulada, provavelmente por incorporarem o corante. *Bacillus* sp cresce de forma mais lenta neste meio.

Para verificação da eficácia do meio na detecção de biosurfactante foi também inoculada uma bactéria não identificada, sendo que após seu crescimento houve a formação de uma zona transparente em torno dela e um halo externo azul intenso. Esta bactéria

cresceu bem neste meio, tendo um aspecto rugoso e não adquiriu coloração azul, permanecendo com uma coloração creme.

SIEGMUND e WAGNER (1991) chamam atenção de que pelo fato de CTAB ser tóxico para algumas bactérias, poderia haver inibição do crescimento das mesmas, citando a possibilidade de substituir este reagente por outros tais como $\text{Al}(\text{OH})_3$ e CaCl_2 .

Desta feita, realizou-se um segundo teste substituindo-se CTAB por CaCl_2 . Ambas não apresentaram a formação de qualquer tipo de halo, sendo que as colônias permaneceram com sua coloração característica (alaranjada para a cepa 9 e creme para B3G). Novamente *Bacillus* sp cresceu de forma deficiente.

Desta forma, provavelmente as cepas 9 e B3G não produzem biosurfactante iônico ou este meio não é adequado para o crescimento e produção de seus respectivos biosurfactantes.

5.9. PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DO BIOSURFACTANTE:

5.9.1. Cepa 9:

O EBLC foi obtido conforme descrito no item 4.2. Antes de centrifugar o caldo de cultivo, observou-se que visualmente não havia vestígios de óleo (aderido à parede dos frascos Erlenmeyer ou no próprio meio), indicando que se não houve consumo total do óleo, talvez este ficou impregnado nas células. Após filtração o EBLC não apresentou vestígios de óleo. Neste caso o processo de centrifugação foi realizado imediatamente após a retirada dos frascos do agitador rotatório após o período de incubação de 48 horas e a seguir o EBLC foi mantido congelado até realizar-se a extração. A figura 25 apresenta o

meio de cultivo contendo o biosurfactante produzido por *Planococcus citreus*.



FIGURA 25: Meio de cultivo contendo o biosurfactante produzido por *Planococcus citreus* em 300 ml de meio de sais e 1,5 % de óleo de oliva, incubado a 30 °C/150 rpm/48 horas.

O volume inicial de EBLC era de 1.065 ml. Na extração de biosurfactante do EBLC de *Planococcus citreus*, com clorofórmio/metanol, foi obtido rendimento de 0,4076 g/l e observou-se que na fase clorofórmio inferior ocorreu a formação de muitas bolhas.

Após completa evaporação do solvente, o extrato obtido tinha um aspecto oleoso de cor alaranjado forte. Uma segunda extração não resultou em quantidade significativa de extrato.

A análise quanto a atividade de emulsificação foi realizada com o EBLC e com o extrato liofilizado conforme item 4.3. Para o extrato foi utilizada a concentração de 0,0014 g em 3,5 ml de água destilada, homogeneizado com auxílio de vortex durante 1 minuto. O sólido apresentou fácil dissolução e a solução forte turvação, dada sua característica de estabilizar emulsão O/A, refletindo seu caráter polar. Após o teste com tolueno a turvação era intensa, persistindo por vários dias. Os resultados são mostrados na Tabela 5 e Figura 26.

TABELA 5: Atividade de emulsificação para biosurfactante produzido por *Planococcus citreus* (9), extraído com clorofórmio/metanol.

Cepa 9	A_{610}
EBLC	0,5837
Extrato liofilizado	1,4910

Os resultados são apresentados como média de duplicatas.

O valor de A_{610} obtido para o EBLC de 48 horas está de acordo com os resultados obtidos em testes anteriores, sendo que valores maiores só foram conseguidos em tempos superiores a 60 horas de incubação (ver item 5.1, figura 11).

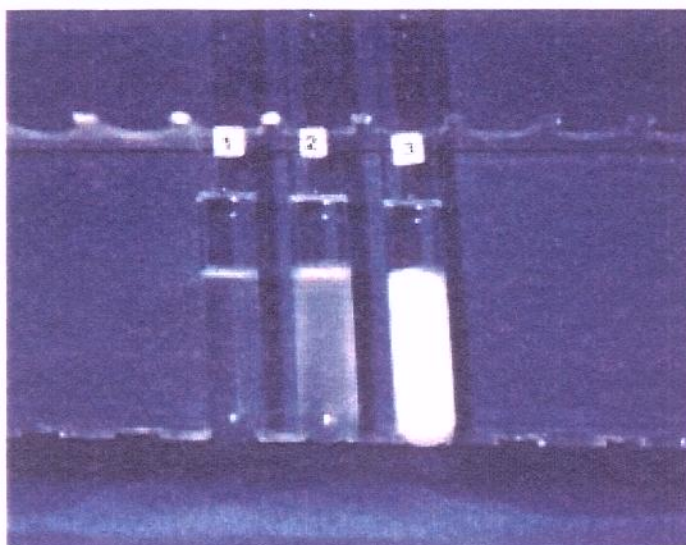


FIGURA 26: Atividade de emulsificação do biosurfactante produzido por *Planococcus citreus*. 1 = EBLC (extrato bruto livre de células), antes de utilizar vortex. 2 = EBLC após homogeneização por 1 minuto com vortex e repouso por 1 hora. 3 = Biosurfactante concentrado e liofilizado (0,0014 g/3,5 ml água destilada) após 1 minuto vortex e repouso por 1 hora.

5.9.2. Cepa B3G:

5.9.2.1. Extração com HCl:

O volume total de EBLC obtido foi de 1.770 ml, tendo um pH inicial de 6,9. Adicionou-se cerca de 2,5 ml de HCl 37 % até atingir pH 2,0.

A extração através de precipitação do biosurfactante com ácido resultou num rendimento de 34,8 mg/l. Na análise da atividade de emulsificação do extrato liofilizado foi pesado 0,02 g e dissolvido com 3,5 ml de água destilada, com o auxílio de vortex. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6: Atividade de emulsificação para biosurfactante produzido por *Bacillus* sp (B3G) extraído por precipitação ácida.

B3G	Halo (cm)	Aspecto
EBLC	2,2	(++++)
Sobrenadante	0	0
Extrato liofilizado	0	0

Como observa-se, a extração com HCl mostrou-se ineficiente, tanto quanto a rendimento e atividade de emulsificação. Como mostrado no item 5.4.2, em pH ácido a atividade de emulsificação é zero, repetindo-se aqui o fato. Provavelmente ocorra hidrólise no biosurfactante produzido por *Bacillus* sp, levando-o a sua inativação.

5.9.2.2. Extração com clorofórmio/metanol:

O volume utilizado de EBLC foi de 480 ml. Novamente, como para a cepa 9, notou-se a formação intensa de bolhas na fase clorofórmio. O rendimento foi de 0,2817 g/l e o aspecto do extrato era de um pó esverdeado. Para a análise de emulsificação com o extrato liofilizado foi utilizado 0,0010 g/3,5 ml de água destilada. Os resultados são mostrados na Tabela 7 e Figura 27.

5.9.2.1. Extração com clorofórmio:

O volume de EBLC utilizado foi de 285 ml. Novamente houve a formação intensa de bolhas na fase inferior clorofórmio e o rendimento foi de 0,2919 g/l.

Em ambos os casos, na extração com clorofórmio/metanol e na extração com clorofórmio, após a evaporação do solvente o extrato obtido tinha o aspecto de um líquido não viscoso e coloração creme. Na

extração com clorofórmio, após liofilização o extrato apresentava-se como um pó de cor creme. Para a análise da atividade de emulsificação, foi utilizado 0,0010 g/3,5 ml de água destilada. A Tabela 7 e figura 27 ilustram os resultados.

TABELA 7: Atividade de emulsificação para biosurfactante produzido por *Bacillus* sp (B3G), extraído com solventes.

	Halo (cm)	Aspecto
EBLC	2,3	(++++)
Clorofórmio/metanol	0,6	(+)
Clorofórmio	2,4	(++++)

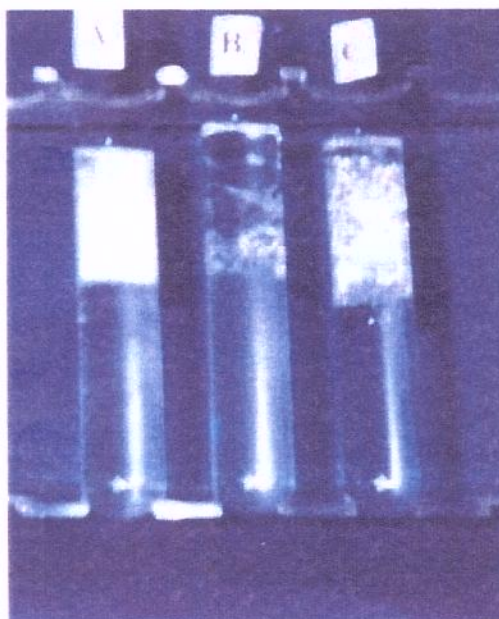


FIGURA 27: Atividade de emulsificação do biosurfactante produzido por *Bacillus* sp. A = EBLC (extrato bruto livre de células). B = biosurfactante extraído com clorofórmio/metanol (2:1:3) (0,0010 g/3,5 ml água destilada). C = biosurfactante extraído com clorofórmio (2:3) (0,0010 g/3,5 ml água destilada).

Observa-se que com a extração com clorofórmio a eficiência é maior. No extrato obtido com clorofórmio/metanol observou-se um aumento da turvação na parte aquosa inferior nos tubos de teste (aumento na absorbância), porém como a turvação não foi significativa, este aspecto não foi considerado.

5.10. ANÁLISE DO EXTRATO LIOFILIZADO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA:

Após borrifamento com rodamina 0,0005 % foram visualizadas manchas referentes aos padrões de óleos e 2 manchas para o extrato de *Planococcus citreus* e 4 manchas para o extrato de *Bacillus* sp, ambos dissolvidos em metanol.

Após borrifamento com ninidrina 0,2 % foram visualizadas manchas rosadas referentes aos padrões, 5 manchas rosadas com diferentes valores de R_f para o extrato obtido de *Planococcus citreus* e uma mancha rosada na origem para *Bacillus* sp conforme a Figura 28.

Após borrifamento com ácido sulfúrico apenas a mancha referente aos padrões de açúcares foi visualizada, além das outras já visíveis.

A reação com ninidrina pode ser um indicativo da presença de um aminogruppo livre e a reação com rodamina 6 G pode ser um indicativo da presença de um grupo lipídico.

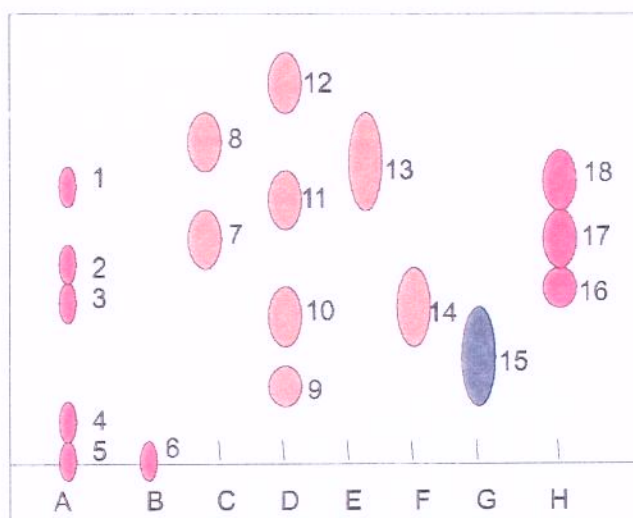


FIGURA 28: Cromatografia em camada delgada para os extratos liofilizados. A = *Planococcus citreus*/metanol, B = *Bacillus* sp/metanol, C = *Planococcus citreus*/clorofórmio, D = *Bacillus* sp/clorofórmio, E = óleo de oliva, F = óleo de soja, G = padrões de açúcares, H = padrões de aminoácidos. Valores de Rf: (1) = 0,21. (2) = 0,15. (3) = 0,12. (4) = 0,03. (5) = origem. (6) = origem. (7) = 0,44. (8) = 0,65. (9) = 0,05. (10) = 0,17. (11) = 0,60. (12) = 0,77. (13) = 0,60. (14) = 0,37. (16) = 0,11. (17) = 0,16. (18) = 0,24. Revelação com rodamina 6 G (manchas em amarelo). Revelação com ninidrina 0,2 % (manchas em rosa). Revelação com ácido sulfúrico (mancha em cinza).

6. CONCLUSÕES:

1. Das três bactérias em estudo, concluiu-se que *Pantoea agglomerans* (cepa B1A) produz um biosurfactante possivelmente ligado à parede celular, fato detectado quando o meio de cultivo era congelado a -18°C sob condições assépticas com células. Neste processo o congelamento feito de uma forma lenta, levava a formação de cristais grandes de gelo, e estes rompiam a parede celular, levando a liberação do agente emulsificante. *Planococcus citreus* (cepa 9) e *Bacillus* sp (cepa B3G) produzem o biosurfactante extracelularmente, podendo ser facilmente extraídos no caldo de cultivo.

2. *Planococcus citreus* produz o biosurfactante com alta atividade após 60 horas de incubação em meio de cultura contendo óleo de oliva como fonte de carbono. O emulsificante hidrofílico produzido foi responsável pela formação de emulsão óleo/água (O/A) e formou micelas preferencialmente na fase aquosa, pois, após homogeneização não ocorreu formação de halo estável, mas sim um aumento nos valores de absorbância, onde podemos assumir que ocorreu a formação de gotículas emulsionadas de tolueno na fase aquosa. Não ocorreram mudanças no pH do meio de cultivo durante o crescimento. A temperatura de crescimento de 50°C afeta a produção do biosurfactante, levando a menor atividade emulsificante. O biosurfactante produzido pela cepa 9 é estável por 1 hora de incubação em diferentes temperaturas (16 a 100°C). Valores de pH ácido diminuem sua atividade, porém na faixa que vai da neutralidade a valores alcalinos a atividade é alta. Concentrações do sal NaCl acima de 30 % diminuem sua atividade.

3. *Bacillus* sp produz um potente biosurfactante já com 24 horas de cultivo, levando a formação de emulsão água/óleo (A/O). Possivelmente forma um emulsificante de caráter lipofílico, devido ao fato de formar halo estável, com gotículas emulsionadas da fração aquosa na fração tolueno. O pH do meio permanece inalterado durante o crescimento e temperaturas de crescimento acima de 40 °C afetam a produção do biosurfactante. O biosurfactante produzido por *Bacillus* sp é estável à temperaturas de 16 a 100 °C. A atividade emulsificante é excelente em valores de pH acima de 6,5, porém perde atividade em pH ácido, possivelmente devido a hidrólise. O biosurfactante mostrou-se estável em concentrações de sal NaCl de 5 a 30 %.

4. Sugere-se que ambas as cepas não produzem um biosurfactante de caráter iônico, demonstrado pelo teste com brometo de cetil trimetil amônio (CTAB).

5. A extração mais efetiva do biosurfactante da cepa 9 foi obtida com clorofórmio/metanol e da cepa B3G foi com clorofórmio.

6. Para *Bacillus* sp o fato de não se conseguir extrair biosurfactante por acidificação do meio, pode ser mais um indicativo de possuir um caráter não iônico.

7. Na análise por cromatografia em camada delgada a reação com ninidrina e rodamina 6 G do biosurfactante de ambas as cepas sugere a possibilidade de haver uma fração lipídica e um grupamento amino livre.

8. Ambas as cepas demonstram um excelente potencial como agentes emulsificantes, caráter este que deve ser melhor explorado em estudos de aplicações diretas em biorremediação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ALENCAR, N. Derramamento de petróleo atinge São Sebastião. **O ESTADO DE SÃO PAULO**, 14/04/1999, <http://www.estado.com.br/edicao/pano/99/04/14/>, 10/03/2000.
2. ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, n. 2, p: 219 – 222, 1995.
3. BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal – state of art (review). **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 15, n. 3, p. 251 – 267, 1995.
4. BRODERICK, L. S.; COONEY J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. **Developments in Industrial Microbiology**, Arlington, v. 23, p. 425 – 434, 1981.
5. CARRILLO, P. G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I.; GIULIETTI, A.M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 82 – 84, 1996.
6. CARVALHO, D.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. Biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 11., São Carlos, 1996. **Anais**. São Carlos: Departamento de Engenharia Química – UFSCar, 1996. p. 686 - 691.
7. CARVALHO, D.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. Production of extracellular surface-active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. In: INTERNATIONAL IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION SYMPOSIUM, 4., 1997, New Orleans. **In situ and on site bioremediation**. Columbus: Battelle Press, 1997. v. 4, p. 91-97.

8. CARVALHO, D.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. Surface active emulsifying agents produced by microorganisms isolated from oil-contaminated soil. In: CONFERENCE PROCEEDINGS – ENVIRONMENTAL STRATEGIES FOR THE 21ST CENTURY. 1998, Singapore. **Proceedings**. Singapore: National University, 1998. p. 564 - 569.
9. CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4, p. 846 –850, 1985.
10. COOPER D.G.; GOLDENBERG B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 224 –229, 1987.
11. COOPER, D.G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 4 –10, 1979.
12. DITTMER, J. C.; LESTER, R. L. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 5, n. 1, p. 126 –127, 1964.
13. DZIEZAK, J. D. Emulsifiers: the interfacial Key to Emulsion stability. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 10, p. 172, 174 –178, 182 – 183, 185 – 186, 1988.
14. FERRAREZZO, E. M. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão**. Campinas, 1998. 88 p. Dissertação (mestrado) – FEA, UNICAMP.
15. 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. **Biotechnology**, New York, v. 8, p. 228 – 230, 1990.

16. HOROWITZ, S.; GILBERT, J.N.; MICHAEL GRIFFIN, W. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 243 – 248, 1990.
17. JAVAHERI, M.; JENNEMAN; G. E.; McINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M. Anaerobic production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 3, p. 698 – 700, 1985.
18. JENNY, K.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: strutral analysis and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 36, p. 5 –13 , 1991.
19. JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S. Bioemulsifier production by na oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 14, n. 6, p. 487 – 490, 1992.
20. KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. (Ed.) **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987. 342 p. (Surfactant science series, v. 25).
21. MELO, L.; PROPATO, V. Ecologia: mancha da vergonha. **ISTO É**. São Paulo, n. 1582, p. 46 – 47, 2000.
22. NAVON- VENEZIA, S.; ZOZIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R., CARMELI, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 9, p. 3240 – 3244, 1995.
23. OLIVEIRA, C. Navios se chocam em Santos. **JORNAL DA TARDE**, 27/07/1998. <http://www.jt.com.br/noticias/98/07/27/>, 10/03/2000.
24. PEIXOTO, D. Pássaro atingido: o segundo desastre ecológico em dois anos (foto). **VEJA**, v. 33, n. 4, p. 46-47, 2000.

25. ROCHA, C.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G.; VIERMA, L.
Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.
World Journal of Microbiology and Biotechnology, Oxford, v. 8,
n. 2, p. 125 – 128, 1992.
26. SAMPAIO, R. M. **Estudo da produção de bioemulsificante de
Saccharomyces lipolytica por fermentação de óleo diesel comercial.**
Campinas, 1995. 80 p. Dissertação (mestrado) –FEA, UNICAMP.
27. SHULGA, A. N.; KARPENKO, E. V.; ELISEEV, S. A.; TUROVSKY.
The method for determination of anigenic bacterial surface-active
peptidolipids. **Microbial Journal**, v. 55, p. 85 –88, 1993.
28. SIEGMUND , I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids
excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar.
Biotechnology Techniques, London, v. 5, n. 4, p. 265 –268, 1991.
29. SINGH, M; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; DESAI, J. D.; SISTA, V.
R. Production of bioemulsifier by a SCP-producing strain of *Candida
tropicalis* during hydrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**,
Kew, v. 12, n. 10, p. 743 – 746, 1990.
30. SPRINGMANN, P. Bioaumento utiliza bactérias selecionadas.
Engenharia de Alimentos, São Paulo, v. 1, n. 4, p. 12 –21, 1996.
31. VAN DYKE, M. I.; COUTURE, P.; BRAUER, M.; LEE, H.; TREVORS,
J. T. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants:
strutural characterization and their use in removing hydrophobic
compounds from soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa,
v. 39, n. 11, p. 1071 – 1078, 1993.
32. VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial
surfactants. **Biotechnology Acta**, v. 9, p. 241 –252, 1991.
33. YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H. L.
Characterization of new lipopeptide surfactant produced by
thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis*
BAS 50. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington,
v. 61, n. 5, p. 1706 – 1713, 1995.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A:

TABELA A1 - Testes bioquímicos para identificação das cepas:

TESTE	9 <i>Planococcus citreus</i>	B3G <i>Bacillus</i> sp	B1A <i>Pantoea agglomerans</i>
Pigmentação	Laranja	Creme	Amarela
Reação Gram	Positivo	Positivo	Negativo
Forma da célula	Coco	Bastonete	Bastonete curto
Arranjo	Isolado ou pares	Ausente	Isolados
Esporos	Ausentes	Terminal	Ausentes
Requerimento de oxigênio	Aeróbio estrito	-	Anaeróbio facultativo
H ₂ S	Negativo	-	Negativo
Oxidase	Negativo	Positivo	Negativo
Catalase	Positivo	Positivo	Positivo
Motilidade	Positivo	Negativo	Positivo
Indol	Negativo	Negativo	Negativo
Vermelho de metila	Negativo	Positivo	Positivo
Voges Proskauer	Negativo	Positivo	Positivo
Hidrólise da esculina	Negativo	Negativo	Negativo
Lipase	Negativo	-	Negativo
Citrato – Simmons	Negativo	Negativo	Positivo
Hidrolise de caseína	Negativo	Negativo	-
Gelatinase	Positivo	Negativo	Positivo
Urease	Negativo	Positivo	Negativo
ONPG	Negativo	Negativo	Positivo

FONTE: CARVALHO, D. (1999) (Dados não publicados).

APÊNDICE B: Tabelas de resultados. Os valores são apresentados como média de análises em duplicata.

TABELA B1: Produção de biosurfactante por *Pantoea agglomerans* cultivada em 1,5 % de querosene em diferentes tempos de cultivo:

Tempo (h)	A ₆₁₀ (Densidade óptica)	Halo de emulsão (cm)	Aspecto da emulsão	pH do meio
24	0,27	2,8	++++	6,8
48	0,25	2,9	++++	7,2
60	0,17	2,8	++++	7,2
72	0,28	2,4	++++	7,2
84	0,25	2,3	++++	7,2
96	0,19	2,3	++++	7,2
108	0,18	2,9	++++	7,2
120	0,31	3,0	++++	7,2

TABELA B2: Produção de biosurfactante por *Planococcus citreus* cultivada em 1,5 % de óleo de oliva em diferentes tempos de cultivo:

tempo (h)	A ₆₁₀ (Densidade óptica)	Halo de emulsão (cm)	Aspecto da emulsão	pH do meio
24	0,16	0	0	5,5
48	0,59	0	0	6,6
60	1,25	0	0	6,6
72	1,05	0	0	6,7
84	1,10	0	0	7,4
96	1,20	0	0	7,5
108	1,15	0	0	7,2
120	1,44	0	0	7,4

TABELA B3: Produção de biosurfactante por *Bacillus* sp cultivado em 1,5 % de óleo de soja em diferentes tempos de cultivo:

tempo (h)	A ₆₁₀ (Densidade óptica)	Halo de emulsão	Aspecto da emulsão	pH do meio
24	0,66	2,5	++++	6,7
48	0,26	2,7	++++	6,9
60	0,14	2,7	++++	7,0
72	0,07	2,7	++++	6,7
84	0,38	2,6	++++	7,0
96	0,03	2,4	++++	7,2
120	0,26	2,4	++++	7,0

TABELA B4: Efeito da temperatura de cultivo na produção de biosurfactante pelas cepas 9 e B3G em meio de cultura contendo 1,5 % de óleo de oliva (OO) e óleo de soja (OS) respectivamente.

Cepa	<i>Planococcus citreus</i> (9)		<i>Bacillus</i> sp (B3G)		
Temperatura de cultivo (°C)	Atividade de emulsificação		Atividade de emulsificação		
	Densidade ótica A ₆₁₀	Halo (cm)	Densidade ótica A ₆₁₀	Halo (cm)	Aspecto da emulsão
30	1,29	0	0,15	2,5	(++++)
40	1,30	0	0,08	0	-
50	0,15	0	0,09	0	-

TABELA B5: Efeito da temperatura na estabilidade do biosurfactante dos EBLC obtidos das linhagens de *Planococcus citreus* e *Bacillus* sp.

cepa	<i>Planococcus citreus</i> (9)	<i>Bacillus</i> sp (B3G)	
Temperatura (°C)	Atividade de emulsificação	Atividade de emulsificação	
	Densidade ótica A_{610}	Halo (cm)	Aspecto
16	1,04	3,2	++++
30	0,97	3,2	++++
40	0,99	3,2	++++
50	0,99	3,4	++++
60	0,67	3,4	++++
70	0,76	3,6	++++
80	0,90	3,5	++++
100	1,03	3,6	++++

TABELA B6: Efeito do pH na atividade do biosurfactante do EBLC produzido pela linhagem *Planococcus citreus* (9).

pH	Atividade de emulsificação
2,2	0,68
3,2	0,31
6,5	1,18
8,9	1,09
10,2	1,05
11,0	1,27

TABELA B7: Efeito do pH na atividade do biosurfactante do EBLC produzido pela linhagem *Bacillus* sp (B3G).

pH	Halo (cm)	Aspecto
2,0	R	-
2,8	R	-
6,5	2,6	++++
8,2	2,4	++++
9,84	2,5	++++
10,45	2,5	++++
11,29	2,5	++++

R = Resíduo

TABELA B8: Efeito da concentração do sal NaCl na atividade do biosurfactante do EBLC produzido pelas linhagens *Planococcus citreus* e *Bacillus* sp.

[NaCl] %	<i>Planococcus citreus</i> (9)	<i>Bacillus</i> sp (B3G)	
	A ₆₁₀ (densidade óptica)	Halo(cm)	Aspecto da emulsão
0	1,03	3,2	++++
5	0,85	3,3	++++
10	0,75	3,2	++++
15	0,94	3,2	++++
20	0,59	3,3	++++
25	0,97	3,3	++++
30	0,28	3,3	++++

TABELA B9: Efeito do tempo de cultivo na produção do biosurfactante pela linhagem *Planococcus citreus* em meio contendo 1,5 % de óleo de oliva:

Tempo (dias)	Biomassa (10^{-3} g/ml)	A ₆₁₀ (densidade óptica)	Halo (cm)	Aspecto da emulsão	pH	Óleo residual (%)	Concentração de biosurfactante (10^{-5} g/ml)
1	1,41	0,30	0	0	5,5	95,5	19,4
2	2,07	0,27	0	0	5,6	87,6	13,8
3	2,21	0,4	0	0	6,0	77,9	10,6
4	2,71	0,93	0	0	7,3	75,0	12,5
5	5,56	1,47	0	0	7,4	74,1	40,0

TABELA B10: Efeito do tempo de cultivo na produção do biosurfactante da linhagem *Bacillus* sp em meio contendo 1,5 % de óleo de soja:

Tempo (dias)	Biomassa (10^{-4} g/ml)	A ₆₁₀ (densidade óptica)	Halo (cm)	Aspecto da emulsão	pH	Óleo residual (%)	Concentração de biosurfactante (10^{-5} g/ml)
1	3,23	0,05	3,4	(++++)	6,9	85,1	13,2
2	2,20	0,06	3,2	(++++)	6,9	92,8	11,2
3	2,64	0,13	3,1	(++++)	6,9	82,5	10,8
4	2,84	0,12	2,9	(++++)	6,9	93,1	13,6
5	4,00	0,08	3,2	(++++)	6,9	97,1	11,2