

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

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIODISSURFATANTE DE
Bacillus subtilis UTILIZANDO MANIPUEIRA COMO
SUBSTRATO**

MARCIA NITSCHKE

Mestre em Microbiologia Agrícola e Ambiental

Prof^a Dr^a. GLÁUCIA MARIA PASTORE

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos, da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos.

Campinas – SP

2004

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

N639p Nitschke, Marcia
Produção e caracterização de biossurfatante de
Bacillus subtilis utilizando manípueira como substrato /
Márcia Nitschke. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.Biossurfatante. 2.Agente tensoativo. 3.Mandioca.
4.*Bacillus subtilis*. I.Pastore, Gláucia Maria Pastore.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em _____ de _____ de 2004, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
IBILCE/UNESP

Profa. Dra. Angela Maria Moraes
FEQ/ UNICAMP

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti
IB/UNICAMP

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
DCA/FEA

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
DEA/FEA

Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
DTA/FEA

“ Um caminho é só um caminho, e não há desrespeito a si ou aos outros em abandoná-lo, se é isto que o coração nos diz....Examine cada caminho com muito carinho cuidado e deliberação. Tente-o muitas vezes, tanto quanto julgar necessário. Só então pergunte a você mesmo, sozinho, uma coisa... Este caminho tem um coração? Se tem o caminho é bom, se não ele não lhe serve. Um caminho é só um caminho.....”

Carlos Castañeda

À minha família: minha mãe Antonia
(*in memoriam*), meu pai Oswaldo e
minhas irmãs Cláudia e Morgana, pois
sem eles eu nada seria.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela luz e proteção

À Profa. Gláucia Maria Pastore pela oportunidade proporcionada

Aos professores da banca examinadora pela contribuição dada ao meu trabalho

Ao Prof. Cesar Costapinto Santana (FEQ) pela permissão do uso de equipamentos no Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais

Ao Prof. Marcos Nogueira Eberlin do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massa (IQ) e em especial aos doutorandos Renato Haddad e Eduardo Cesar Meurer pela ajuda, empenho e interesse nas análises realizadas

À Gizelda Maria Alves (FAENQUIL) pelas análises de infra-vermelho

À Profa. Maria Silvia Gatti (Laboratório de Virologia - IB) e ao Dr. Rovilson Gilioli pela oportunidade de aprender e acompanhar a realização dos testes de atividade anti-viral

À Plaza S.A. pela doação da manipueira

À CAPES pela bolsa concedida

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, em especial a Cristina, Alvaro, Marcelo, Margarida, Mareci, Severino, Cláudio, Júlio, Hermelinda, Biba, Maria Eugênia, Haroldo, Luciana Ferracini, Luciana Fleuri, Luciana Bittar, Alice, Ana Maria, Giselle e Fernanda, por terem caminhado comigo, colaborando, trocando idéias, me escutando e me apoiando nos momentos de certezas e incertezas

Aos professores e funcionários do Laboratório de Bioquímica, em especial à Profa. Hélia Sato e aos técnicos Bia e Guilherme pela disponibilidade e boa vontade em me ajudar em qualquer necessidade. E aos estagiários Paulo e Eliane pela ajuda e amizade

Aos amigos Maybi, Jorge e Lurdes, Cayo, Marilú e Sindy pela amizade e companheirismo

À todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 Classificação, natureza química e microrganismos envolvidos:	4
3.2 Função fisiológica dos biossurfatantes:	5
3.3 Propriedades dos biossurfatantes:.....	6
3.4 Aplicações dos biossurfatantes:.....	8
3.5 Produção de biossurfatantes:.....	14
3.5.1 Substratos alternativos:	16
3.5.2 Cinética de produção dos biossurfatantes:	19
3.6 Extração e purificação:	20
3.7 Biossurfatantes produzidos pelo gênero <i>Bacillus</i> :	21
3.7.1 Surfactina:	22
3.8 Manipueira:	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Microrganismos e meios de cultura:.....	29
4.2 Seleção de microrganismos produtores de biossurfatante em manipueira:	31
4.2.1 Microrganismos:.....	31
4.2.2 Meios:.....	31
4.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo:.....	31
4.2.4 Determinação da Tensão Superficial:	31
4.2.5 Determinação da Diluição Micelar Crítica (CMD):	32
4.2.6 Crescimento em ágar manipueira:	32
4.3 Seleção do meio de manipueira para a produção de biossurfatantes:	32
4.3.1 Microrganismo:.....	32
4.3.2 Meios:.....	32
4.3.3 Inóculo e condições de cultivo:.....	32
4.3.4 Determinação do número de células viáveis:	33
4.3.5 Concentração de biossurfatante bruto:	33
4.3.6 Determinação de carboidratos totais:.....	33
4.3.7 Concentração Micelar Crítica (CMC):.....	34
4.4 Cinética de produção do biossurfatante:.....	35
4.5 Caracterização quanto às propriedades e composição química:.....	35
4.5.1 Estudos de estabilidade:.....	35

4.5.1.1 Estabilidade de pH :	35
4.5.1.2 Estabilidade de temperatura:	35
4.5.1.3 Estabilidade frente à força iônica:	35
4.5.2 Determinação da Tensão Interfacial:	35
4.5.3 Extração e purificação do biossurfatante produzido:	36
4.5.3.1 Extração:	36
4.5.3.2 Purificação: cromatografia de adsorção:	36
4.5.4 Caracterização química:	37
4.5.4.1 Cromatografia de camada delgada:	37
4.5.4.2 Análise de composição bioquímica:	37
4.5.4.3 Análise de aminoácidos:	37
4.5.4.4 Espectroscopia de infravermelho:	37
4.5.4.5 Espectrometria de massa – ESI :	37
4.6 Aplicações do biossurfatante obtido:	38
4.6.1 Atividade emulsificante (E_{24}):	38
4.6.2 Potencial para biorremediação:	38
4.6.3 Atividade antimicrobiana:	38
4.6.4. Atividade antiviral e citotoxicidade:	39
4.6.4.1 Linhagens celulares e vírus:	39
4.6.4.2 Teste de citotoxicidade:	40
4.6.4.3 Ativação dos vírus:	40
4.6.4.4. Atividade antiviral:	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Seleção de microrganismos produtores de biossurfatante em manipueira:	42
5.2 Seleção do meio de manipueira para produção de biossurfatante	47
5.3 Cinética de produção do biossurfatante	51
5.4 Caracterização quanto às propriedades e composição química	60
5.5 Aplicações do biossurfatante obtido:	69
6. PRINCIPAIS RESULTADOS	78
7. CONCLUSÃO	80
8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais classes de biossurfatantes e microrganismos envolvidos na sua produção.....	5
Tabela 2. Principais aplicações comerciais dos biossurfatantes	13
Tabela 3. Características físico-químicas da manipueira utilizada neste trabalho.	27
Tabela 4. Valores de tensão superficial obtidos em meio basal e em manipueira F.	43
Tabela 5. Valores de tensão superficial e CMD para isolados de <i>Bacillus</i> sp. frente a manipueira integral (I) e sem sólidos (F).	44
Tabela 6. Valores de diâmetro de crescimento dos isolados de <i>Bacillus</i> em ágar manipueira integral (I) e sem sólidos (F).	45
Tabela 7. Comparação do crescimento celular, produção de surfatante, atividade tensoativa e consumo de carboidratos por <i>B. subtilis</i> LB5a em diferentes meios de manipueira.	48
Tabela 8. Efeito da adição de surfatante no meio de cultura de <i>B.subtilis</i> 21332.	57
Tabela 9. Atividade emulsificante do biossurfatante de LB5a obtido em manipueira	70
Tabela 10. Atividade antimicrobiana do lipopeptídeo de <i>B. subtilis</i> LB5a.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i>	23
Figura 2. Fluxograma de produção de farinha de mandioca	28
Figura 3. Determinação da CMC através de diluições sucessivas do meio de cultura.....	34
Figura 4. Percentagem de redução na tensão superficial obtida pelos isolados de <i>Bacillus</i> em meio basal e manipueira F.....	44
Figura 5. Crescimento do isolado <i>Bacillus</i> LB5a em ágar manipueira F e manipueira I ...	46
Figura 6. Valores de CMC ⁻¹ do surfatante de <i>B.subtilis</i> LB5a em meios de manipueira .	50
Figura 7. Cinética de produção de surfatante por <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira F..	52
Figura 8. Cinética de produção de surfatante por <i>B. subtilis</i> 21332 em manipueira F.....	53
Figura 9. Consumo de carboidratos por <i>B. subtilis</i> 21332 e <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira F.....	54
Figura 10. Atividade de protease e produção de surfatante por <i>B. subtilis</i> 21332 em manipueira F.....	56
Figura 11.Efeito da temperatura (100°C) sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.	61
Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.	61
Figura 13. Efeito da força iônica sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.....	62
Figura 14. Cromatografia em camada delgada do padrão de surfactina e da amostra semi-purificada do surfatante obtido por <i>B. subtilis</i> LB5a em manipueira.	63
Figura 15. Espectro infravermelho da amostra de surfatante de <i>B. subtilis</i> LB5a	65
Figura 16. Comparação dos espectros de infravermelho do padrão de surfactina e da amostra de biossurfatante de <i>B. subtilis</i> LB5a	66
Figura 17. Espectrometria de massas da amostra de surfatante e da surfactina.padrão ..	67
Figura 18. Fragmentação (ESI-MS/MS) do íon de <i>m/z</i> 1036.	68
Figura 19. Atividade emulsificante do surfatante LB5a com diferentes hidrocarbonetos...	70
Figura 20. Capacidade de remoção de petróleo de amostra de areia utilizando solução de biossurfatante produzido por <i>B. subtilis</i> LB5a	71
Figura 21. Águas de lavagem da areia impregnada com petróleo.	72
Figura 22. Teste de atividade antimicrobiana do surfatante obtido por <i>B. subtilis</i> LB5a....	74
Figura 23. Efeito citopático dos vírus sobre as linhagens celulares.	76

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a potencialidade do uso da manipueira (resíduo líquido da fabricação de farinha de mandioca) como substrato alternativo para a produção de biossurfatantes por bactérias do gênero *Bacillus*. Os isolados LB2a, LB2b, LB5a, LB262 e LBB que apresentaram tensão superficial inferior a 30mN/m em meio de manipueira foram inicialmente selecionados; o isolado LB5a que apresentou tensão superficial de 26,95mN/m, CMD^{-1} de 27,24mN/m e CMD^{-2} de 33,23mN/m em manipueira F (sem sólidos) e 29,02mN/m, 29,84mN/m e 36,75mN/m respectivamente em manipueira I (contendo sólidos) e o maior diâmetro de crescimento em ágar manipueira foi selecionado como produtor potencial de biossurfatante no substrato proposto. Dentre os diferentes tipos de preparações de manipueira avaliadas para a produção de biossurfatante por *Bacillus* LB5a, a manipueira F gerou os melhores resultados de atividade tensoativa, concentração de surfatante bruto e CMC^{-1} . Os estudos cinéticos revelaram que *B. subtilis* LB5a produziu 3,0 g/L de surfatante com CMC^{-1} máxima de 90; enquanto que a cepa 21332 produziu 2,2 g/L de surfatante com CMC^{-1} máxima de 63. A cepa *B. subtilis* 21332 apresentou uma queda acentuada na concentração de surfatante após 48 horas de cultivo em manipueira F, sendo que a degradação do surfatante demonstrou relação direta com a atividade de protease presente no meio.

O surfatante de *B. subtilis* LB5a mostrou ser termoestável, estável em valores de pH acima de 5,0 e resistente a presença de até 20% de cloreto de sódio. O produto possui 38,5% de proteínas e 53,6% de lipídeos, caracterizando-o como um lipopeptídeo com a presença de ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina na proporção molar de 1:1:1,2:3,4 respectivamente. A CMC estimada foi de 33 mg/L e a tensão interfacial conta hexadecano 0,96 mN/m. A análise estrutural permitiu concluir que o surfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira é surfactina, sendo que o íon de m/z 1036 foi a forma predominante. Sete aminoácidos na seqüência RO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu foram detectados. O surfatante obtido formou emulsões estáveis com diversos hidrocarbonetos, óleo de soja e gordura de côco.

Pseudomonas aeruginosa e *Micrococcus luteus* se mostraram sensíveis à presença de 100-200 μ g de surfatante enquanto que a inibição da infectividade de VSIV (vírus da estomatite vesicular) e MHV-3 (vírus da hepatite murina) ficou evidenciada em concentrações de 12,5 μ M e 5 μ M respectivamente. A citotoxicidade em linhagens celulares L929 e BHK-21 foi demonstrada para concentrações acima de 12,5 μ M e 15 μ M respectivamente.

SUMMARY

The aim of this work was to investigate the potential of cassava flour wastewater (manipueira) as an alternative substrate for biosurfactant production by *Bacillus* sp. The isolates LB2a, LB2b, LB5a, LB262 and LBB that showed surface tension lower than 30 mN/m in the cassava medium were selected first. The isolate LB5a was selected as a potential surfactant producer in cassava substrate, giving surface tensions of 26.95mN/m, CMD⁻¹ of 27.24mN/m and CMD⁻² of 33.23mN/m in manipueira F (no solids) and 29.02mN/m, 29.84mN/m and 36.75mN/m respectively in manipueira I (with solids); this isolate also showed the highest diameter of growth in manipueira agar. Among the different types of cassava wastewater preparations evaluated for the production of biosurfactant by *Bacillus* LB5a, manipueira F medium showed the best results for surface activity, concentration of crude surfactant and CMC⁻¹. Kinetics studies showed that *B. subtilis* LB5a gave 3.0 g/L of surfactant and a CMC⁻¹ of 90; while the strain 21332 gave 2.2 g/L of surfactant and a CMC⁻¹ of 63. *B. subtilis* 21332 showed an unusual and drastic drop in surfactant concentration after 48 hours of growth in manipueira F, and the biosurfactant degradation was directly related to protease activity present in the culture medium.

Stability studies showed that the LB5a surfactant was thermostable, stable at pH values above 5.0 and resistant to NaCl concentrations up to 20%. The product had 38.5% of proteins and 53.6% of lipids characterizing it as a lipopeptide. The aminoacid composition showed the presence of glutamic acid, aspartic acid, valine and leucine in a ratio of 1:1:1.2:3.4 respectively. The estimated CMC value was 33mg/L and the interfacial tension against hexadecane 0.96 mN/m. Structural analysis demonstrated that the biosurfactant produced by the *B. subtilis* LB5a isolate in cassava wastewater medium was the lipopeptide surfactin, and the ion of *m/z* 1036 was the predominant isoform. Seven aminoacid residues in the sequence RO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu were detected. The biosurfactant was able to form stable emulsions with several hydrocarbons as well as with soybean oil and coconut fat.

Pseudomonas aeruginosa and *Micrococcus luteus* were the most sensitive bacteria to the presence of 100-200µg of surfactant, while infectivity inhibition of VSIV (vesicular stomatitis indiana virus) and MHV-3 (murine hepatitis virus) was shown at a concentration of 12.5µM and 5µM respectively. The cytotoxicity of the product against L929 and BHK cell lines was observed at concentrations over 12.5 µM and 15µM respectively.

1. INTRODUÇÃO

Os surfatantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A produção mundial de surfatantes excede 3 milhões de toneladas por ano (Banat, 2000), sendo que a maior parte é utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico.

A grande maioria dos surfatantes disponível comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, levou à procura por surfatantes biológicos como alternativa aos produtos existentes.

Os biossurfatantes produzidos por microrganismos vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos devido à sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações. Entre as aplicações comerciais dos biossurfatantes destacam-se a recuperação de petróleo, biorremediação de poluentes, formulação de lubrificantes, além de diferentes utilizações na indústria têxtil, cosmética, alimentícia e farmacêutica (Banat et al., 2000).

Atualmente, os biossurfatantes ainda não são amplamente utilizados pela indústria devido ao alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. Porém, o problema econômico da produção de biossurfatantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo. Uma possível alternativa para a produção de biossurfatantes seria o uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. Atualmente, o aproveitamento de resíduos vem sendo incentivado por contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam simplesmente descartados.

A manipueira é o resíduo líquido gerado pelas indústrias de processamento de mandioca. Durante a fabricação da farinha de mandioca são gerados ao redor de 300 L

de manipueira por tonelada de raiz processada (Barana, 2000). Estima-se que cerca de 60% das raízes colhidas sejam empregadas na produção de farinha, o que representa em torno de 15 milhões de toneladas por ano (Del Bianchi & Cereda, 1999). Apesar de altamente poluente, este resíduo pode ser considerado não esgotado, ou seja, pode ser empregado como matéria-prima para outros processos industriais por apresentar altas concentrações de carboidratos, nitrogênio e sais minerais. Entre as alternativas para o uso deste resíduo encontra-se a produção de biossurfatantes.

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

Santos et al. (1999) sugeriram que a manipueira poderia ser um meio alternativo para produção de biossurfatantes, conseqüentemente, se faz necessário esclarecer a potencialidade do uso de diferentes tipos de manipueira, bem como estudar a cinética de produção e caracterizar o biossurfatante produzido neste substrato.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Investigar a potencialidade técnica do uso da manipueira como substrato para produção de biossurfatantes por *Bacillus* sp.

Objetivos específicos:

- Selecionar microrganismo com potencial para produção de biossurfatantes em manipueira
- Definir o meio de manipueira mais adequado para a produção de biossurfatante
- Caracterizar o biossurfatante produzido na manipueira quanto às suas propriedades e composição química.
- Investigar aplicações para o biossurfatante obtido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os surfatantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia de hidrocarboneto enquanto que a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica (Desai & Banat,1997).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfatantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases com diferentes graus de polaridade (líquido/líquido ou gás/líquido). A formação de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz a tensão interfacial e superficial, sendo esta uma propriedade única dos surfatantes. Esta propriedade torna estes compostos adequados para várias aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização dos surfatantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões, detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (Banat, 2000).

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas), microrganismos (glicolípídeos) e também no organismo humano (sais biliares), sendo utilizados para atividades intra e extracelulares como a emulsificação de nutrientes, transporte de materiais através das membranas celulares e no reconhecimento celular (Bognolo, 1999).

Compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfatantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfatantes (Cameotra & Makkar, 1998). Consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras.

Apesar de sua importância biológica, os biossurfatantes têm sido objeto de pesquisa sistemática há menos de meio século, atrelados aos trabalhos de desenvolvimento de

novos antibióticos, quando se observou que muitas culturas apresentavam atividade tensoativa ao final do processo (Bognolo, 1999).

3.1 Classificação, natureza química e microrganismos envolvidos:

Os biossurfatantes são classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. Os microrganismos produtores se distribuem em diversos gêneros, sendo a maioria produzida por bactérias. As principais classes de biossurfatantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfatantes poliméricos e surfatantes particulados (Desai & Desai, 1993).

Os biossurfatantes poliméricos são constituídos por diversos grupos químicos diferentes como, por exemplo, o emulsan, no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos (Rosenberg & Ron, 1999), ou o liposan, constituído por carboidratos e proteínas (Cirigliano & Carman, 1984).

Algumas células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial sendo consideradas por si só como biossurfatantes, como por exemplo, algumas espécies de *Cyanobacteria* e patógenos como *S. aureus* e *Serratia* sp. Bactérias do gênero *Acinetobacter* sp., quando crescem em hexadecano produzem vesículas extracelulares que têm função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfatante (Kappeli & Finnerty, 1979). As vesículas e células microbianas com atividade tensoativa são classificadas como biossurfatantes particulados.

Os biossurfatantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbonada de um ou mais ácidos graxos que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Cameotra & Makkar, 1998; Bognolo, 1999). A maioria dos biossurfatantes são neutros ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros (Tabela 1).

Tabela 1. Principais classes de biossurfatantes e microrganismos envolvidos na sua produção.

Tipo de Biossurfatante	Microrganismos
Glicolipídeos	
- rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
- trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Sufactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfatantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfatantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte: Desai & Banat (1997)

3.2 Função fisiológica dos biossurfatantes:

Embora o exato papel fisiológico dos biossurfatantes ainda não tenha sido completamente elucidado, algumas funções lhes têm sido atribuídas:

- emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (Francy et al., 1991). Entretanto esta hipótese é contestada pelo fato de que cepas de *Bacillus subtilis* produzem surfatantes apenas em substratos hidrossolúveis (Cooper et al., 1981).

- transporte de hidrocarbonetos: parece ser uma função dos biossurfatantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis* (Kapelli & Fiechter, 1977) onde um aumento significativo da porção lipídica do glicolípido de membrana foi detectado quando o microrganismo crescia em alcanos, em comparação com meio contendo glicose, onde a porção lipídica era insignificante, indicando que o complexo polissacarídeo-ácido graxo presente na superfície celular poderia estar envolvido no transporte de hidrocarbonetos.

- aderência/liberação da célula de superfícies: pela excreção de biossurfatantes que podem formar um filme em uma interface, estimulando certos microrganismos a se ligarem a superfícies, enquanto inibe a adesão de outros. Uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possam se multiplicar. Os elementos chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células a superfícies. Os microrganismos podem utilizar o biossurfatante ligado à parede celular para regular as propriedades da superfície celular visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (Rosenberg & Ron, 1999).

- atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfatantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. Os ramnolípídeos de *P. aeruginosa* e a surfactina de *B. subtilis* funcionam como antibióticos solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfatantes no meio, esses microrganismos apresentam maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (Lin, 1996).

3.3 Propriedades dos biossurfatantes:

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfatantes. Segundo Bognolo (1999),

muitas destas características representam uma vantagem sobre os surfatantes convencionais:

- atividade superficial e interfacial: os biossurfatantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfatantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial com menores concentrações de biossurfatante (Cooper & Paddock, 1984). Segundo Mulligan & Gibbs (1993), a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfatantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L. As tensões interfacial e superficial (medida de efetividade) de um bom biossurfatante devem ser menores que 1 e 30 mN/m, respectivamente. Bognolo (1999) comparou a CMC de biossurfatantes e tensoativos sintéticos demonstrando que os primeiros apresentam menor CMC ou seja, são mais eficientes que os surfatantes convencionais.

- tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfatantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 horas e pH entre 5-12 (Horowitz et al., 1990). Os biossurfatantes suportam concentrações de 10% de NaCl, enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfatantes convencionais (Bognolo, 1999).

- biodegradabilidade: diferentes dos surfatantes químicos, os biossurfatantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (Mulligan & Gibbs, 1993).

- baixa toxicidade: os biossurfatantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (Cameotra & Makkar, 1998) e sua baixa toxicidade permite seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Flasz et al., 1998).

Os biossurfatantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (Desai & Banat, 1997).

Segundo Reiser et al. (1989) os biossurfatantes possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfatantes sintéticos em termos de efetividade e eficiência. Outra vantagem dos biossurfatantes reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo, fator importante à medida em que os preços do petróleo aumentam. Além disso, a estrutura química e as propriedades físicas dos biossurfatantes podem ser modificadas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas.

3.4 Aplicações dos biossurfatantes:

O maior mercado para os biossurfatantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados no processo de extração de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (Van Dyke et al., 1991). Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e recuperação terciária de petróleo. Porém, o campo de aplicação em crescimento é o de alimentos, produtos farmacêuticos e de higiene e cosmética.

Biorremediação:

Os acidentes com derramamento de óleo tornaram-se numerosos e têm causado muitos problemas sociais e ecológicos. Os biossurfatantes aumentam a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos. A capacidade dos biossurfatantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de

poluentes. Entretanto, os estudos ainda ocorrem em nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biossurfatantes permanece ainda como um desafio (Atlas, 1991).

Segundo Lang & Wagner (1993) os biossurfatantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos.

O uso de biossurfatantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. Karanth et al. (1999) relataram a degradação de hexaclorociclohexano pelo biossurfatante produzido por *Pseudomonas* Ptm+. Outros organoclorados como DDT e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau.

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

Bognolo (1999) relatou que os biossurfatantes de *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas.

Limpeza de reservatórios de óleos:

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos ou podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfatantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfatante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático (Bognolo, 1999). Banat et al. (1991), utilizaram biossurfatante produzido pela bactéria Pet 1006 para a

limpeza de tanques em substituição aos surfatantes convencionais. O produto bacteriano promoveu a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo.

Recuperação terciária do petróleo (MEOR):

A MEOR (microbial enhanced oil recovery) consiste de uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (Banat, 1995b). O microrganismo produz polímeros e surfatantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros do mineral. Os biossurfatantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (Banat, 1995a; 1995b).

Segundo Banat (1995a) o uso de biossurfatantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biossurfatantes no reservatório e subseqüentes propagação *in situ*; ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos selvagens produtores de surfatantes; ou ainda a produção de biossurfatantes em reatores e posterior injeção no reservatório. A última estratégia é mais cara devido à necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biossurfatante (Moses,1987). As outras requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir quantidades suficientes de surfatante (Banat et al., 2000).

Para serem úteis na MEOR *in situ*, os microrganismos devem estar aptos a crescer em condições extremas como alta temperatura, pressão, salinidade e baixa tensão de oxigênio (Karanth et al., 1999). Muitos microrganismos adaptados a condições extremas e com capacidade para recuperação de óleo cru, têm sido isolados e estudados. Jenneman et al. (1983), propuseram o uso em MEOR do isolado *Bacillus licheniformis* JF-2, anaeróbio, halotolerante e termotolerante e produtor de um biossurfatante muito efetivo.

Aplicações terapêuticas:

Inibição da formação de coágulos e hemólise, formação de canais iônicos em membranas, atividade antitumoral e atividade antimicrobiana são algumas aplicações terapêuticas relacionadas a biossurfatantes de *Bacillus* (Arima et al., 1968; Peypoux et al., 1999).

O biossurfatante produzido por *R. erythropolis* inibiu a multiplicação do vírus do herpes simples e vírus parainfluenza (Uchida et al., 1989).

Thimon et al. (1995) descreveram outro biossurfatante com atividade antifúngica chamado de iturina, um lipopeptídeo produzido por *B. subtilis* que afeta a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras.

Velraeds-Martine et al. (1996) relataram a inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por biossurfatante produzido por *Lactobacillus*. Os autores sugeriram o desenvolvimento de agentes antiadesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes.

Biossurfatantes na agricultura:

Os biossurfatantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são hidrofóbicos e agentes emulsificantes são necessários para dispersá-los em soluções aquosas (Rosenberg & Ron, 1999). Patel & Gopinathan (1986) relataram que biossurfatantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis.

Stanghellini & Miller (1997) concluíram que os rhamnolipídeos possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoosporos.

Biossurfatantes na mineração:

Os biossurfatantes podem ser utilizados para a dispersão de minerais inorgânicos em mineração e processos fabris. Kosaric et al. (1987) isolaram compostos tensoativos

produzidos por culturas de *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp., que podem ser utilizados para flotação e separação de eschelita e calcita. A recuperação foi de 95% para CaWO_4 e 30% para CaCO_3 respectivamente, ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais.

Rosenberg et al. (1988) relataram o uso do biodispersan, polissacarídeo aniônico produzido por *A. calcoaceticus* A2, na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água. Já Polman et al. (1994) relataram a solubilização de carvão utilizando biossurfatantes de *C. bombicola*.

Produtos de higiene e cosméticos:

Os biossurfatantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos, principalmente devido a sua compatibilidade com a pele (Brown, 1991).

Alguns soforolipídeos são utilizados comercialmente como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. A KAO Co. LTDA desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídeos, que são esterificados posteriormente, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (Desai & Banat, 1997).

A preparação de biossurfatantes por ação enzimática (principalmente por lipases) sobre moléculas hidrofóbicas deu uma nova dimensão à produção destes compostos, principalmente para aplicação em produtos de higiene e cosméticos (Banat et al., 2000).

Indústria de Alimentos:

Os biossurfatantes são utilizados como emulsionantes para o processamento de matérias-primas. A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura bem como na dispersão de fase (Banat et al., 2000) e na solubilização de aromas (Banat, 2000).

Os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos cárneos, onde influenciam nas características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (Vater, 1986).

O bioemulsificante produzido por *C. utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (Shephord et al., 1995).

Outras aplicações:

Outros campos de utilização dos biossurfatantes incluem a indústria de papel, têxtil e cerâmica. O biodispersan tem aplicação na indústria de tintas (Rosenberg & Ron, 1999), facilitando o manuseio, pois as partículas decantam mais lentamente, gerando maior espalhabilidade e aumentando as propriedades de mistura. Os biossurfatantes também são utilizados na fabricação de extintores de incêndio para a estabilização de espuma (Reiser et al., 1989). Um resumo das funções e aplicações industriais dos biossurfatantes é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Principais aplicações comerciais dos biossurfatantes

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

Fonte: Banat, 2000; Banat et al., 2000.

3.5 Produção de biossurfatantes:

Após serem produzidos, os biossurfatantes podem ser mantidos no interior das células, aderidos às membranas ou excretados para o meio (Desai & Banat, 1997).

A fonte de carbono é muito importante na produção de biossurfatantes. Os microrganismos utilizam uma grande variedade destas fontes que incluem hidrocarbonetos, carboidratos e óleos vegetais.

Segundo Haferburg et al. (1986) os microrganismos produtores de compostos tensoativos podem ser divididos em três categorias segundo a fonte de carbono utilizada: aqueles que produzem surfatantes exclusivamente a partir de hidrocarbonetos, como *Candida lipolytica*; aqueles que produzem surfatantes somente com substratos hidrossolúveis, como *Bacillus* sp. e aqueles que produzem surfatantes tanto com hidrocarbonetos quanto com substratos hidrossolúveis, como *Pseudomonas* sp.

O tipo, as propriedades e a quantidade de biossurfatante produzido por uma cultura microbiana dependem não somente do microrganismo utilizado mas também do substrato disponível. A modificação do substrato freqüentemente altera a estrutura do produto e, conseqüentemente, suas propriedades (Reiser et al., 1989).

Diferentes fontes de carbono podem influenciar não só a composição do biossurfatante mas também a maneira como é produzido. Cepas de *Arthrobacter* produzem 75% de biossurfatante intracelular quando crescem em etanol ou acetato, porém, com hidrocarbonetos, a produção se torna totalmente extracelular (Reiser et al., 1989).

Os trehalose lipídeos produzidos por *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Corynebacterium* são modificados para sacarose e frutose lipídeos quando estes crescem em sacarose e frutose (Reiser et al., 1993).

A estrutura da porção lipídica do glicolípido de *Rhodococcus erythropolis* é influenciada pelo tamanho da cadeia do hidrocarboneto utilizado (Lin, 1996).

Outros nutrientes que afetam a produção de biossurfatantes incluem nitrogênio, fosfatos, íons metálicos e outros componentes (Lin, 1996).

As fontes de nitrogênio utilizadas na produção de biossurfatantes são muito variadas e dependem do microrganismo utilizado, incluindo desde fontes orgânicas complexas como milhocina, peptonas, farinha de peixe, uréia e autolisado de leveduras, até fontes inorgânicas como nitrato de amônio, sulfato de amônio e outros (Mulligan & Gibbs, 1993).

Guerra-Santos et al. (1986) reportaram máxima produção de ramnolipídeos após limitação de nitrogênio com relação carbono/nitrogênio (C/N) entre 16:1 a 18:1 e ausência de produção sem limitação de nitrogênio (relação C/N de 11:1). De acordo com Hommel et al. (1987), durante a produção de biossurfatante de *Torulopsis apicola*, o rendimento de biomassa depende, principalmente, da quantidade absoluta de nitrogênio e não da natureza da fonte nitrogenada, enquanto que a concentração da fonte de carbono determina a conversão a biossurfatante.

Segundo Peypoux & Michel (1992) a estrutura da surfactina é influenciada pela concentração de aminoácidos no meio. Roubin et al. (1989) relataram que o nitrato de amônio foi superior a cloreto de amônio e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio para a produção de surfactina.

A adição de ácido glutâmico e asparagina aumenta a produção de liquenesina-A por *B. licheniformis* BAS50 (Yakimov et al., 1995).

A produção de biossurfatantes pode também ser influenciada pelo metabolismo do fosfato (Mulligan et al., 1989). A relação carbono/fósforo (C/P) é muito importante na produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* (Guerra-Santos et al., 1986). O fosfato inorgânico também é importante pela sua capacidade tamponante. A produção de lipopeptídeos de *B. liqueniformis* JF-2 pode ser aumentada através da redução na concentração de fosfato do meio (Lin et al., 1994).

A adição de ferro e manganês aumentou o rendimento de surfactina de *B.subtilis* (Cooper et al., 1981). Wei & Chu (1998) relataram um aumento de dez vezes na produção de surfactina quando a concentração de ferro no meio foi aumentada para 4 μ M, resultando em níveis maiores que os atribuídos a cepas geneticamente selecionadas.

A produção de biossurfatantes pode ser estimulada ou inibida pela adição de antibióticos como penicilina e cloranfenicol (Rubinovitz et al., 1982); além disso, a adição de precursores pode modificar a estrutura e o rendimento final do produto (Peypoux & Michel, 1992).

As condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfatantes pelo seu efeito sobre o crescimento e atividade celular (Desai & Banat, 1997). Sheppard & Cooper (1990) concluíram que a transferência de oxigênio é um parâmetro chave para a otimização e ampliação de escala na produção de surfactina por *B.subtilis*.

3.5.1 Substratos alternativos:

Segundo Kosaric et al. (1984) diferentes estratégias podem ser enfocadas e exploradas para reduzir os custos da produção de biossurfatantes; como exemplo, tem-se o uso de microrganismos adaptados ou modificados visando aumentar o rendimento, o desenvolvimento de métodos simplificados para recuperação do produto e o uso de substratos de baixo custo. A economia é o fator crucial para o desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico; o sucesso da produção industrial de biossurfatantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de matérias-primas de baixo custo, uma vez que estas representam em torno de 30% do custo total (Cameotra & Makkar, 1998). Apesar disto, poucos trabalhos têm sido publicados visando a produção de biossurfatantes em resíduos, principalmente pelo baixo rendimento obtido quando comparado com meios tradicionais (Makkar & Cameotra, 1999b).

Uma das principais dificuldades na seleção de um resíduo como substrato alternativo é encontrar a composição adequada de nutrientes que permitam tanto o crescimento celular como o acúmulo do produto de interesse. Em geral, substratos agroindustriais contendo altos níveis de carboidratos ou lipídeos suprem as necessidades para uso como fonte de carbono para produção de biossurfatantes (Mercade & Manresa, 1994). Sabe-se que a biossíntese de surfatantes é influenciada pela concentração de carboidratos (relação C/N), concentração de fosfato (relação C/P) e pela presença de minerais como Fe, Mn e Ca (Cooper et al., 1981).

Mulligan & Cooper (1985) consideraram a utilização de água residual de turfa na produção de biossurfatantes por *B. subtilis*. O resíduo continha quantidades significativas de carboidratos como glicose, galactose e xilose além de aminoácidos e ácidos orgânicos, adequadas para o crescimento e produção de biossurfatante. Embora o rendimento não tenha sido descrito, os autores relataram um valor de CMC de 8 mg/L.

Koch *et al.* (1988) relataram a produção de surfatante por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* contendo o gene *lac Z* de *E. coli*, permitindo o crescimento e produção de rhamnolipídeos, utilizando soro de leite como substrato.

Sandrin et al. (1990) relataram a produção de 0,5 g/L de surfactina utilizando amido como fonte de carbono.

Mercade et al. (1993) propuseram a utilização de resíduos da extração de óleo de oliva para a produção de rhamnolipídeos por *P. aeruginosa* JAMM e Ohno et al. (1995) relataram a produção de iturina e surfactina por *B. subtilis* NB22 em farelo de trigo e okara (resíduo de soja) por fermentação sólida.

Babu et al. (1996) compararam a produção de rhamnolipídeos em meio sintético e em resíduos de destilaria e soro de leite. A taxa de crescimento específica e a taxa de formação de produto foram melhores para os resíduos do que para o meio sintético,

sugerindo que estes resíduos podem ser utilizados na produção industrial destes surfatantes.

Makkar & Cameotra (1997) demonstraram a produção de biossurfatantes por *B. subtilis* termofílicos em meio de cultivo contendo melaço e sugeriram aplicação na MEOR.

Fox & Bala (2000) concluíram que *B. subtilis* é capaz de produzir biossurfatantes a partir de resíduos de processamento de batatas, substituindo fontes de carbono tradicionais.

Thompson et al. (2000) compararam a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em resíduos da indústria de batatas e em meio basal. Apesar de gerar níveis mais baixos que o correspondente meio basal, os autores afirmaram que o produto obtido no resíduo possui potencial para uso em biorremediação e MEOR.

A produção de biossurfatantes por biotransformação tem recebido considerável atenção nos últimos anos. O principal objetivo deste processo é a alteração de diferentes porções hidrofóbicas e hidrofílicas através de fermentação microbiana e posterior união destas porções por tratamento enzimático, obtendo moléculas surfatantes (Desai & Banat, 1997). Segundo Lin (1996) os principais problemas na aplicação de enzimas para a produção de biossurfatantes são o alto custo das enzimas e a dificuldade de solubilização dos substratos hidrofóbicos e hidrofílicos no meio de reação. Por outro lado, a produção de biossurfatantes por fermentação microbiana tem a desvantagem nos altos custos dos processos de recuperação e no grande volume de resíduos gerados.

Outro fator importante a ser considerado quando se pretende estabelecer um processo biotecnológico a partir de substratos alternativos é a dificuldade de padronização devido às variações naturais de composição, sendo muitas vezes necessária a suplementação de nutrientes além de monitoramento constante, bem como a avaliação dos custos de transporte, armazenagem e tratamento prévio necessários. Além disso, as dificuldades analíticas e metodológicas geram a necessidade de

desenvolvimento de metodologias específicas para cada tipo de resíduo utilizado (Mercade & Manresa, 1994). Entretanto, a utilização de resíduos pode diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e custos de tratamento (Makkar & Cameotra, 2002).

3.5.2 Cinética de produção dos biossurfatantes:

Segundo Desai & Banat (1997) os parâmetros cinéticos da produção de biossurfatantes podem ser agrupados em quatro tipos principais: produção associada ao crescimento; produção sob condições de limitação de crescimento; produção por células em repouso ou imobilizadas e produção com suplementação de precursores.

Quando a produção está associada ao crescimento, ocorre relação paralela entre crescimento, utilização de substrato e produção de biossurfatante. A produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas sp*; glicoproteínas por *P.fluorescens*; agentes tensoativos de *Bacillus cereus* IAF346 e biodispersan de *Bacillus* IAF 343 são exemplos de produção associada ao crescimento (Desai & Banat, 1997).

A produção de emulsan por *Acinetobacter calcoaceticus* é um exemplo de produção mista, ou seja, associada e não associada ao crescimento. Substâncias como o emulsan se acumulam na superfície celular durante o crescimento exponencial, e são liberados no meio quando a síntese protéica diminui (Goldman et al., 1982).

A produção sob limitação de crescimento é caracterizada pelo aumento agudo nos níveis de biossurfatante como resultado da limitação de um ou mais componentes do meio de cultura. A superprodução de biossurfatante por *Pseudomonas spp.* ocorre quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento devido à limitação de nitrogênio ou ferro (Guerra-Santos et al., 1986).

A produção por células em repouso ou imobilizadas consiste em um tipo de produção no qual não ocorre multiplicação celular. As células, entretanto, continuam a

utilizar as fontes de carbono para produção de biossurfatante. Exemplos deste tipo de produção incluem sofrólipídeos de *Torulopsis bombicola* e *Candida apicola* e trehalose tetraésteres de *Rhodococcus erythropolis*. A produção de biossurfatantes por células imobilizadas é importante na redução de custos de recuperação, à medida que as fases de crescimento e formação de produto podem ser separadas (Desai & Banat, 1997).

3.6 Extração e purificação:

Segundo Desai & Banat (1997), a recuperação dos biossurfatantes depende principalmente de sua carga iônica, solubilidade e localização (intracelular, extracelular ou ligado à parede celular). O isolamento de biossurfatantes hidrossolúveis extracelulares geralmente envolve várias etapas de concentração enquanto que o isolamento de biossurfatantes associados a paredes celulares ou insolúveis em água é relativamente mais fácil (Lin, 1996).

Em geral, compostos intracelulares requerem maiores custos de recuperação, pois as células devem ser primeiramente rompidas por meios mecânicos ou enzimáticos antes da purificação, adicionando mais uma etapa ao processo (Mulligan & Gibbs, 1993).

Quando hidrocarbonetos são usados como fonte de carbono, surge a dificuldade de separar o surfatante sem deixar traços de substrato no produto final. Este aspecto é muito importante se o produto for aplicado na indústria de alimentos ou farmacêutica (Mulligan & Gibbs, 1993).

A técnica mais utilizada para a recuperação de biossurfatantes é a extração com solventes orgânicos como metanol, clorofórmio, butanol e hexano. Os trehalolipídeos, sofrólipídeos e liposan são exemplos de biossurfatantes extraídos com solventes (Desai & Banat, 1997).

A precipitação com sulfato de amônio é utilizada para a extração de emulsan e biodispersan. A surfactina e outros biossurfatantes carregados produzidos por *Bacillus* podem ser extraídos por precipitação ácida, ajustando o pH do meio para o ponto

isoelétrico do composto desejado, enquanto que biossurfatantes de *Pseudomonas sp.* e *Candida tropicalis* são extraídos por precipitação com acetona (Mulligan & Gibbs, 1990).

A ultrafiltração tem sido utilizada para a separação de biossurfatantes do meio de fermentação, como no caso de glicolipídeos, utilizando a capacidade dos biossurfatantes em formar micelas ou agregados acima da CMC, que podem ser retidos em membranas de exclusão de alto peso molecular (Lin & Jiang, 1997).

A surfactina de *B. subtilis* pode ser removida do meio através da coleta da espuma sendo posteriormente precipitada e extraída com solventes. Praticamente toda a surfactina permanece na espuma, diminuindo perdas e permitindo a remoção contínua e *in situ* do produto (Cooper et al., 1981).

Para a extração em larga escala ou para o isolamento contínuo de surfatantes do meio de fermentação também foram relatadas técnicas de cromatografia de adsorção, troca iônica e para sua purificação, HPLC e filtração em gel (Lin, 1996).

3.7 Biossurfatantes produzidos pelo gênero *Bacillus*:

Algumas bactérias do gênero *Bacillus* produzem diversos lipopeptídeos que demonstram grande propriedade tensoativa (Rosenberg & Ron, 1999).

Culturas de *B. subtilis* produzem um lipopeptídio cíclico conhecido como surfactina ou subtilisina (Arima et al., 1968). Algumas cepas de *B. subtilis* produzem, além da surfactina, outros lipopeptídeos cíclicos denominados iturina A e fengicina como co-produtos durante a fermentação (Ohno et al., 1995, Hbid et al., 1996). Besson & Michel (1992) determinaram que a produção de surfactina iniciava na fase logarítmica enquanto que a da iturina ocorria durante a fase estacionária.

Cepas de *B. liqueniformis* e *B. pumilus* produzem liquenisina (halobacilina) e pumilamicina, respectivamente, ambos derivados estruturais peptídicos da surfactina (Lin et al., 1994; Yakimov et al., 1995). Todos os lipopeptídeos tensoativos consistem estruturalmente de diversos aminoácidos ligados covalentemente com o grupo carboxila e

hidroxila de ácidos graxos β -hidróxi. As estruturas variam na composição de aminoácidos, posição do anel lactona e na porção lipídica (Yakimov et al., 1995).

3.7.1 Surfactina:

A história da surfactina iniciou em 1968 quando Arima et al. relataram a presença de um novo composto biologicamente ativo em culturas de *B. subtilis*. Este composto foi chamado de surfactina pela sua excepcional atividade tensoativa. Posteriormente, Kakinuma et al. (1969) elucidaram a estrutura lipopeptídica da surfactina.

Em termos estruturais a surfactina consiste em um heptapeptídeo unido por ligação lactônica a um ácido graxo β -hidróxi contendo de 13 a 15 carbonos (Figura 1).

As propriedades físico-químicas da surfactina foram descritas por Arima et al. (1968). A surfactina é um lipopeptídeo aniônico de massa molecular igual a 1050 ± 100 Da. Apresenta-se na forma de cristais em agulha de coloração branca, com ponto de fusão entre 137-140°C. É solúvel em água alcalinizada, acetona, metanol, etanol, benzeno, clorofórmio e ácido acético glacial, sendo insolúvel em água e ácidos minerais e fracamente solúvel em tetracloreto de carbono, éter de petróleo, hexano e ciclohexano. É estável em pH de 7-9 a 120 °C por 30 minutos, apresenta reação positiva para biureto e negativa para ninhidrina, sendo precipitada em soluções alcalinas com 50% de saturação com sulfato de amônio ou metais divalentes.

A surfactina é considerada um dos mais potentes biossurfatantes conhecidos. Segundo Cooper & Zajic (1980), a CMC da surfactina em água é de 25 mg/L e a tensão superficial atinge níveis de 25 mN/m. A tensão interfacial contra hexadecano é de 1mN/m.

A biossíntese dos surfatantes envolve a síntese da porção lipídica e da porção hidrofílica (peptídica) e subsequente união das duas porções. Segundo Mulligan & Gibbs (1993) o controle do metabolismo intermediário de carboidratos é muito importante para a produção de surfactina. A chave para a formação da porção lipídica ocorre no nível da

transformação da acetil-CoA pela isocitrato desidrogenase no ciclo de Krebs. A produção de surfactina se inicia a medida em que a atividade da isocitrato desidrogenase diminui.

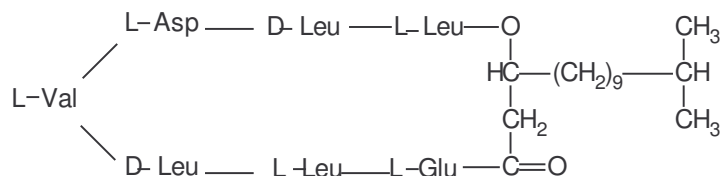


Figura 1. Estrutura química da surfactina produzida por *Bacillus subtilis*.

Roubin et al. (1989) determinaram que quando ocorria a redução da atividade da isocitrato desidrogenase pela queda na tensão de oxigênio, aumento da taxa de crescimento ou pela adição de ácido cítrico, o metabolismo de *B. subtilis* poderia ser desviado do ciclo de Krebs (energia) para o acúmulo de lipídeos, com conseqüente aumento nos níveis de surfactina.

Em contraste com a maioria dos metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*, a biossíntese da surfactina ocorre durante a fase de crescimento e também na fase pós-exponencial (Vater, 1986).

A biossíntese da surfactina é catalisada extra-ribossômicamente pela ação de um complexo multienzimático chamado de surfactina-sintetase (Peypoux et al., 1999).

Cooper et al. (1981) definiram um meio mineral mínimo para a produção de surfactina, contendo sais minerais, nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono (meio basal de Cooper). Os autores também estabeleceram a necessidade e o efeito estimulante dos íons ferro e manganês sobre a produção do surfatante.

A sacarose e a frutose também foram mencionadas como fontes de carbono eficientes, enquanto que a presença de glicerol diminuiu a produção de surfactina

(Peypoux et al, 1999). Em contraste com outros biossurfatantes, a biossíntese de surfactina não é estimulada pela presença de hexadecano (Sandrin et al.,1990).

Kim et al. (1997) modificaram a fonte de nitrogênio do meio de Cooper e limitaram o nível de oxigênio, direcionando o fluxo energético para a biossíntese de produto, obtendo 7 g/L de surfactina ou seja, aproximadamente dez vezes mais do que o rendimento obtido no meio basal.

Wei & Chu (1998) demonstraram um aumento significativo na produção de surfactina através da suplementação do meio de cultura com ferro, enquanto que Davis et al. (1999) demonstraram que a produção de surfactina é influenciada fortemente pelo metabolismo de nitrogênio. Os autores sugeriram que há uma ligação entre o aumento da produção de surfactina com o crescimento celular sob limitação de nitrato.

Ohno et al. (1995) utilizaram fermentação sólida para a produção de surfactina em resíduos da fabricação de tofu, atingindo níveis entre 4 à 5 vezes melhores que a correspondente fermentação submersa.

As condições de cultivo das cepas de *B.subtilis* geralmente incluem aerobiose e temperaturas entre 30-37°C, embora isolados termofílicos já tenham sido relatados (Makkar & Cameotra,1997).

A surfactina é freqüentemente extraída do meio de cultura por métodos clássicos que incluem precipitação ácida, recristalização e extração com solventes orgânicos. Para purificação são utilizados métodos cromatográficos. Mulligan & Gibbs (1990) propuseram um método de ultrafiltração para a concentração e purificação do lipopeptídeo, enquanto que Razafindralambo et al. (1993) sugeriram extração por fase sólida.

A técnica de fracionamento com espuma oferece a vantagem de remoção contínua do surfatante do meio de fermentação, sem perda significativa de biomassa, além de impedir a ocorrência de retroinibição (Cooper et al.,1981).

Dentre os efeitos biológicos atribuídos ao lipopeptídeo surfactina, destaca-se a atividade antimicrobiana (Arima et al., 1972), atividade antitumoral (Kameda et al., 1974) e atividade antiviral (Vollenbroich et al., 1997a). A ação da surfactina parece estar relacionada a alterações na integridade das membranas, devido a capacidade do lipopeptídeo em interagir com os fosfolípidos presentes nas membranas celulares (Maget-Dana & Ptak, 1995).

Segundo Peypoux et al. (1999), uma grande variedade de derivados estruturais obtidos por modificações na cadeia peptídica da surfactina têm sido relatados, desde variantes estruturais, como a pumilacidina (Naruse et al., 1990), variantes biossintéticos (Peypoux et al. 1994), variantes obtidos por técnicas moleculares (Stachelhaus et al., 1995) e surfactina quimicamente modificada (Glu- γ -metil éster de surfactina) (Thimon et al., 1994). Segundo Thimon et al. (1994) a surfactina quimicamente modificada demonstrou melhor atividade tensoativa e menor CMC, sugerindo que a alteração na porção peptídica pode gerar novos lipopeptídeos com diferentes propriedades, sendo possível a construção de novas moléculas com maior gama de aplicações.

A modificação genética de linhagens de *B. subtilis* visando aumento da produção de surfactina também tem sido proposta. Mulligan et al. (1989) utilizaram radiação ultravioleta para obter um mutante capaz de produzir 3,5 vezes mais surfactina que a linhagem original. Ohno et al. (1992) relataram que a produção de surfactina era 1,5 vezes maior em *B. subtilis* recombinante no qual foi introduzido um plasmídeo contendo genes relacionados à produção do lipopeptídeo.

Apesar de suas propriedades tensoativas e biológicas, a surfactina ainda não é explorada comercialmente devido principalmente ao alto custo de produção associado ao baixo rendimento. Mais recentemente, outras aplicações têm sido demonstradas incluindo emulsificação, agente espessante e estabilizador de espuma (Razafindralambo et al., 1998).

3.8 Manipueira:

A mandioca, raiz muito consumida no Brasil, pode ser utilizada diretamente na alimentação ou destinada à indústria para produção de farinha e fécula. O aproveitamento industrial gera resíduo líquido e sólido que, se forem dispensados sem tratamento, apresentam forte impacto ambiental em função da grande quantidade de matéria orgânica e da presença de compostos tóxicos (Cereda, 1994).

Na fabricação da farinha de mandioca são gerados resíduos como a casca, o farelo e a manipueira (Figura 2). Manipueira é uma palavra de origem tupi-guarani que significa “o que brota da raiz de mandioca”, e consiste na água de constituição da mandioca, extraída na prensagem da massa ralada, durante a produção de farinha. Durante a fabricação da farinha de mandioca são gerados aproximadamente 300 L de manipueira por tonelada de raiz processada (Barana, 2000). Estima-se que cerca de 60% das raízes colhidas sejam empregadas na produção de farinha o que representa em torno de 15 milhões de toneladas por ano (Del Bianchi & Cereda, 1999).

O potencial poluidor da manipueira é considerável devido à grande concentração de material de origem orgânica não esgotado, sendo agravado em função do grande volume gerado. Além de poluente, o resíduo é tóxico pela presença de glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto, como a linamarina e a lataustralina. Estes compostos são hidrolisados em presença de ácidos ou enzimas, gerando radicais livres de cianeto e a seguir, de ácido cianídrico (Cereda, 1994). Sem solução de baixo custo, as empresas (principalmente pequenas) acabam por descartar o efluente em rios ou terrenos próximos. Estas fábricas se concentram em determinadas regiões, geralmente próximas à fonte de matéria-prima, agravando ainda mais o problema ambiental (Barana, 2000).

Na Tabela 3 são apresentados alguns dados sobre a composição da manipueira utilizada neste trabalho. Nota-se que a manipueira é constituída por carboidratos,

nitrogênio e diversos sais minerais que tornam este resíduo passível de ser aproveitado para o cultivo de microrganismos.

Entre os possíveis usos da manipueira em processos biotecnológicos destacam-se a produção de biomassa oleaginosa (Efung & Wosiacki, 1998), a produção de bioaromas (Damasceno, 1999), a produção de biogás (Barana, 2000) e a produção de biossurfatantes (Santos et al., 1999).

Tabela 3. Características físico-químicas da manipueira utilizada neste trabalho.

Variáveis	Concentração
Sólidos totais (g/L)	62,00
DQO (g/L)	55,80
Açúcares totais (g/L)	41,45
Açúcares redutores (g/L)	18,25
Açúcares não-redutores (g/L)	23,27
Nitrogênio total (g/L)	2,08
Fósforo (mg/L)	244,5
Potássio (mg/L)	3472,60
Cálcio (mg/L)	292,53
Magnésio (mg/L)	519,00
Enxofre (mg/L)	154,00
Ferro (mg/L)	7,80
Zinco (mg/L)	2,80
Manganês (mg/L)	1,70
Cobre (mg/L)	1,00
pH	5,8

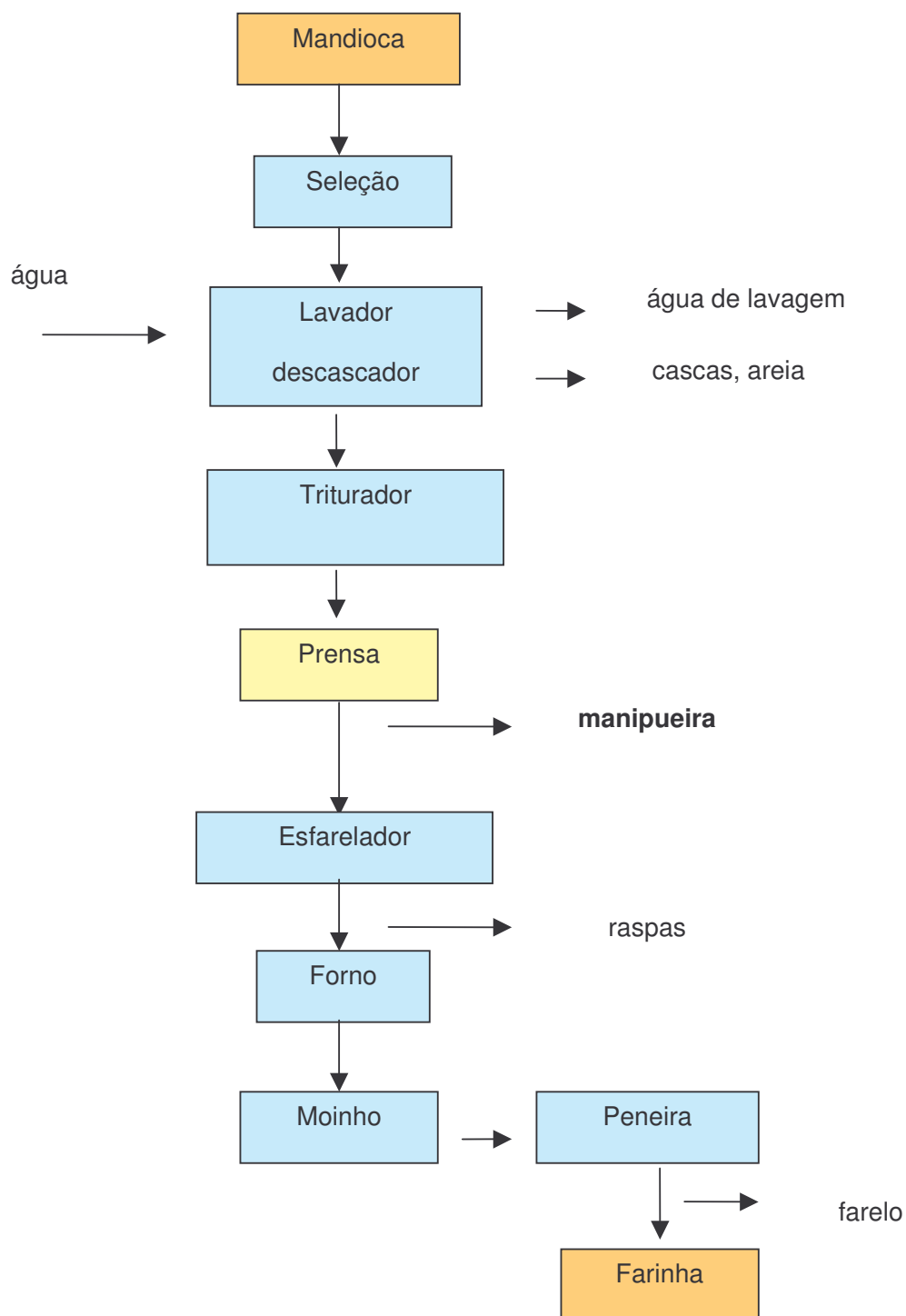


Figura 2. Fluxograma de produção de farinha de mandioca (Del Bianchi & Cereda, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e meios de cultura:

4.1.1 Microrganismos: isolados de *Bacillus* sp. pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos e *Bacillus subtilis* ATCC 21332, proveniente da American Type Culture Collection – EUA.

4.1.2 Meios de cultura: para manutenção das bactérias foram utilizados tubos contendo ágar nutriente (NA) inclinado. As culturas foram mantidas em geladeira (5°C) e repicadas a cada 30 dias. Para a produção de biossurfatante foram utilizados o meio basal (Cooper et al., 1981) e manipueira.

- **Meio basal** (%): glicose 3.0, NaCl 5.0, NH₄SO₄ 0.1, MgSO₄ 0.025, extrato de levedura 0.05, solução de minerais 1.0 (contendo g/L: MnSO₄ 3.0, FeSO₄ 0.10, CaCl₂ 0.1, ZnSO₄ 0.1, CuSO₄ 0.01, H₃BO₃ 0.01, NaMnO₄ 0.01) em tampão fosfato 0,2M e pH 6,5.

- **Manipueira:**

a) Coleta e armazenamento da manipueira: o resíduo foi coletado na fábrica (Plaza S. A.) e conduzido imediatamente ao laboratório, sendo posteriormente homogeneizado e distribuído em garrafas plásticas mantidas a -18°C.

b) Caracterização do substrato: a composição de minerais, nitrogênio e carbono da manipueira foi determinada pelo Laboratório de Análise de Solos e Planta do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), de acordo com a legislação vigente.

Os açúcares presentes foram determinados de acordo com as seguintes metodologias:

- Carbohidratos totais:método fenol-sulfúrico, conforme Daniels et al. (1994).
- Açúcares redutores totais: método colorimétrico (DNS), segundo Miller (1959).
- Glicose, frutose, sacarose e maltose: por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Waters (modelo 600E) acoplado a detector de índice de refração. Coluna YMC Pack Poliamina II (5µm, 120Å ; 4,6 x 250mm ID) e fase móvel acetonitrila/água (75:15) com fluxo de 1 mL/min a 25°C. Os açúcares

presentes nas amostras foram determinados através de comparação dos tempos de retenção de soluções padrão de glicose, sacarose, maltose e frutose.

c) Preparo dos meios de manipueira: após descongelamento do resíduo foram preparados os meios:

- Manipueira integral (I): contendo sólidos em suspensão (6,2 % p/v sólidos totais); a manipueira foi homogeneizada e distribuída em frascos erlenmeyers.
- Manipueira decantada e centrifugada (F): sem a presença de sólidos insolúveis. Partindo-se do princípio de que o amido possui a capacidade de absorver água quando aquecido (aumentando seu peso), a remoção do amido e outros sólidos insolúveis presentes no resíduo foi feita por aquecimento seguido de decantação e centrifugação. A manipueira foi submetida a aquecimento até fervura e resfriada a temperatura ambiente. O meio resfriado foi centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante constituiu-se no meio manipueira F.
- Manipueira decantada (IPS): a manipueira foi deixada em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas para decantação natural das partículas em suspensão. O sobrenadante foi coletado e distribuído em frascos. Sólidos totais 2,3% (p/v).
- Manipueira integral diluída (I/2): diluída 50% com água destilada. Sólidos totais 3,8% (p/v).
- Manipueira decantada e centrifugada diluída (F/2): diluída 50% com água destilada.

O pH dos meios não foi modificado, mantendo-se em torno de 5,8 - 5,9 (pH natural da manipueira). Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C, 1 atm por 15 minutos.

4.2 Seleção de microrganismos produtores de biossurfatante em manipueira:

4.2.1 Microrganismos:

Onze isolados de *Bacillus* produtores de surfatantes, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos- FEA (originalmente isolados de amostras de solo e vegetais) e a cepa padrão *B.subtilis* ATCC 21332.

4.2.2 Meios:

Para seleção inicial de microrganismos potenciais foram utilizados meios de manipueira F e meio basal como controle.

4.2.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo:

Uma alçada das culturas mantidas a 4°C foi transferida para erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo nutriente, incubando-se em agitador rotatório à 120 rpm, 30°C por 24 horas. Visando a padronização do número de células iniciais de cada isolado testado, a densidade ótica do inóculo foi medida em espectrofotômetro a 610 nm utilizando como branco caldo nutriente estéril. Os valores de densidade ótica foram ajustados na faixa entre 0,4-0,5 através de diluições com o meio de cultura. Após ajuste, inoculou-se 1 mL de cada cultura a ser testada em frascos erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL dos respectivos meios e incubando-se em agitador rotativo tipo shaker a 30°C, 150 rpm por 72 horas. Os experimentos foram conduzidos em três repetições independentes. Após o cultivo, os meios foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante livre de células foi submetido às medidas de tensão superficial e diluição micelar crítica (CMD).

4.2.4 Determinação da Tensão Superficial:

A medida da tensão superficial foi realizada em tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12 . As análises foram realizadas pelo método de placa, utilizando uma placa de platina-irídio com perímetro molhado de 40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm, denominada placa de Wilhelmy. As condições de análise foram: volume

médio da amostra de 10 ml, temperatura de 20-25 °C, intervalos de medidas 15s, e desvio padrão referente a 5 medidas $\leq 0,20$ mN/m.

4.2.5 Determinação da Diluição Micelar Crítica (CMD):

Alíquotas de 0,1ml e 1ml dos meios de cultura centrifugados foram diluídos 10 vezes (CMD^{-1}) e 100 vezes (CMD^{-2}) em água destilada, sendo as tensões superficiais das respectivas diluições determinadas conforme descrito acima.

4.2.6 Crescimento em ágar manipueira:

A manipueira foi adicionada de ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L e esterilizada em autoclave, sendo posteriormente distribuída em placas estéreis. As placas com ágar manipueira foram marcadas com um círculo central de 0,5 cm de diâmetro. Com auxílio de alça de platina, os isolados selecionados foram inoculados na região delimitada da placa incubando-se a 30°C por 24 horas. Após este período, o diâmetro de crescimento (cm) de cada isolado no ágar manipueira foi medido.

4.3 Seleção do meio de manipueira para a produção de biossurfatantes:

4.3.1 Microrganismo:

Utilizou-se o microrganismo produtor de biossurfatante selecionado na etapa anterior (*Bacillus* LB5a) . O microrganismo foi submetido a testes bioquímicos de identificação utilizando o sistema API 50CH (BioMérieux) para identificação da espécie. Os resultados permitiram a identificação deste microrganismo como *Bacillus subtilis*.

4.3.2 Meios:

Manipueira I, IPS, F, F/2, I/2 preparados conforme descrito em 4.1.2 c.

4.3.3 Inóculo e condições de cultivo:

A partir de uma cultura estoque mantida em geladeira preparou-se um tubo inclinado incubando-se por 24 horas a 30°C. Duas alçadas da cultura foram transferidas para um frasco erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo nutriente, incubando-se nas condições acima por 8-12 horas até a cultura atingir 10^8 ufc/mL. Após a incubação, 1 mL

da cultura a ser testada foi inoculada em frascos erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL dos respectivos meios e incubando-se em agitador rotativo (shaker) a 30°C e 150 rpm por 72 horas, sendo retiradas quatro amostras. Os experimentos foram conduzidos em triplicata com três repetições independentes.

Análises: alíquotas de 1 ml de cada meio foram retiradas e submetidas à medida de pH e contagem de células viáveis. O volume restante foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante livre de células submetido às medidas de tensão superficial, diluição micelar crítica (CMD), concentração micelar crítica recíproca (CMC^{-1}), concentração de biossurfatante bruto e carboidratos totais.

4.3.4 Determinação do número de células viáveis:

Utilizou-se a técnica de diluições sucessivas e plaqueamento pelo método da gota (Miles & Misra, 1938). Uma alíquota de 1 mL de amostra foi diluída em 9 mL de água destilada estéril e misturada vigorosamente por inversão. Esta primeira diluição foi sucessivamente diluída e gotas de 20 μ L de cada diluição foram colocadas na superfície de placa contendo ágar nutriente com auxílio de pipeta automática. Após incubação em estufa a 30°C, o número de colônias presentes em cada gota foi contado e expresso em ufc/mL.

4.3.5 Concentração de biossurfatante bruto:

Uma alíquota do meio de cultura livre de células foi adicionada de HCl 6N até pH 2,0 e mantida por aproximadamente 12 horas a 4°C. O precipitado foi coletado após centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos e recuperado com água destilada (pH 2,0), sendo colocado em recipientes de alumínio (previamente tarados) e levando para estufa a 60°C por 24 horas e dessecador, até peso constante. O peso foi determinado por diferença calculando-se posteriormente a concentração (m/v).

4.3.6 Determinação de carboidratos totais:

Método fenol-sulfúrico, conforme Daniels et al. (1994).

4.3.7 Concentração Micelar Crítica (CMC):

A determinação da CMC foi realizada segundo técnica descrita por Sheppard & Mulligan (1987), através de medidas da tensão superficial do meio de fermentação (livre de células) diluído sucessivamente, com igual volume de água destilada. As medidas foram feitas até que o valor de tensão se aproximasse ao valor da água. Construiu-se um gráfico de concentração (%) no meio de cultura x TS (tensão superficial), sendo que a concentração micelar crítica é o valor da concentração que corresponde ao ponto central de inflexão da curva (Figura 3). A CMC^{-1} corresponde ao valor de diluição necessário para atingir a CMC. No exemplo acima a CMC é de aproximadamente 1,4% e a CMC^{-1} ou seja $1/CMC = 1/1,4 \times 100 = 71,4$. Portanto, o meio deve ser diluído aproximadamente 71 vezes para atingir a CMC; abaixo, exemplifica-se o método utilizado para o cálculo.

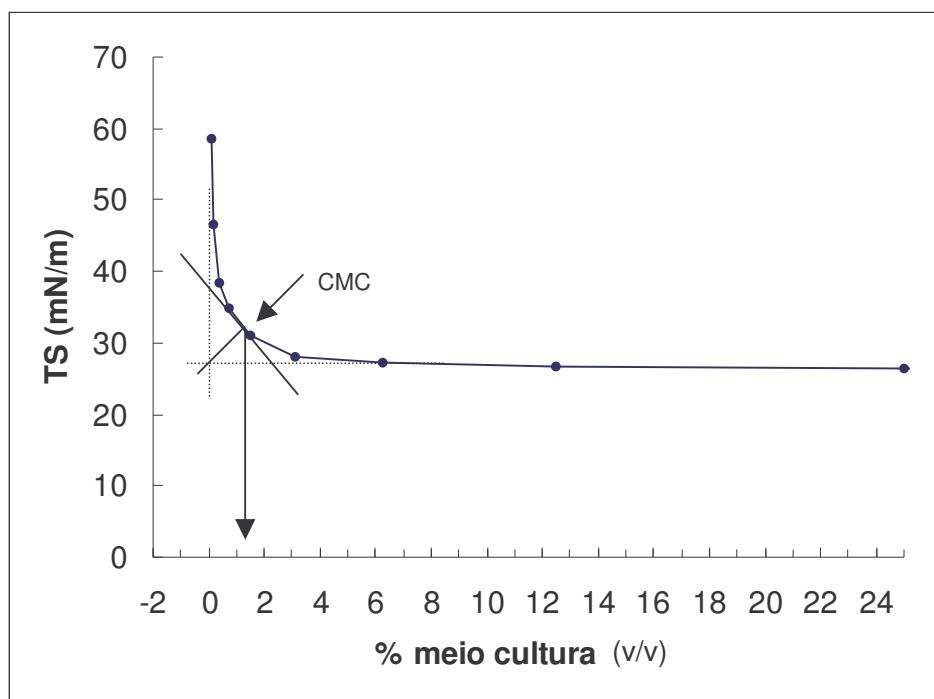


Figura 3. Determinação da CMC através de diluições sucessivas do meio de cultura.

4.4 Cinética de produção do biossurfatante:

As bactérias *Bacillus subtilis* LB5a e *Bacillus subtilis* ATCC 21332, foram cultivadas em meio manipulada F, definido na etapa anterior. As condições de cultivo foram as mesmas relatadas no item 4.3.3. e as amostras foram retiradas a cada 12 horas para análises. A atividade de protease foi determinada no meio de cultura livre de células segundo metodologia descrita por Fleuri (2003).

4.5 Caracterização quanto às propriedades e composição química:

4.5.1 Estudos de estabilidade:

Após cultivo por 48 horas, o meio de manipulada livre de células foi submetido a testes de estabilidade.

4.5.1.1 Estabilidade de pH :

O pH do meio foi ajustado para valores entre 2 a 12 com NaOH ou HCl 1N. Após 30 minutos a tensão superficial e CMD foram determinadas, conforme descrito em 4.2.4 e 4.2.5.

4.5.1.2 Estabilidade de temperatura:

O meio foi aquecido a 100°C durante 15, 30, 60, 90 e 120 minutos e a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento a tensão superficial e CMD foram medidas. O congelamento da amostra a -15°C por 6 meses também foi avaliado.

4.5.1.3 Estabilidade frente à força iônica:

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

4.5.2 Determinação da Tensão Interfacial:

A medida da tensão interfacial foi realizada em tensiômetro Krüss Processor Tensiometer modelo K12, utilizando método da placa. As medidas foram realizadas com meios de cultura isentos de células contra hexadecano como meio imiscível. Primeiramente, o aparelho foi zerado com hexadecano, que constitui a fase leve da mistura; em seguida 10

ml do meio de cultura contendo o biossurfatante foram colocados no aparelho, a placa foi ajustada e 10 mL de hexadecano foram adicionados cuidadosamente procedendo-se a medida nas mesmas condições estabelecidas para tensão superficial.

4.5.3 Extração e purificação do biossurfatante produzido:

A extração foi realizada segundo Makkar & Cameotra (1999a) após cultivo em manipueira F por 48 horas.

4.5.3.1 Extração:

A extração primária foi realizada por precipitação ácida, ajustou-se o pH do meio de cultivo livre de células para 2,0 com HCl 6N e o mesmo foi mantido a 4°C por aproximadamente 12 horas. O biossurfatante foi separado por centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos. O precipitado obtido foi redissolvido em água destilada ajustando-se o pH da solução para 7,0. Colocou-se a solução em estufa a 50 °C até secagem. O produto obtido foi extraído com clorofórmio/metanol (65:15 v/v) e filtrado em papel filtro comum. A mistura solvente filtrada foi colocada em cápsula de porcelana e levada à estufa 50°C até secagem. O produto semi-purificado obtido foi utilizado nas etapas de purificação.

4.5.3.2 Purificação: cromatografia de adsorção:

Amostras de 0,4g do biossurfatante bruto obtido na extração primária foram dissolvidas em 5 mL de clorofórmio/metanol (65:15 v/v) e transferidas para coluna empacotada (25 x 2,0 cm) com sílica gel 60. O produto foi eluído com solventes de polaridade crescente. Os solventes utilizados foram clorofórmio, clorofórmio/metanol (2:1 v/v) e metanol, utilizando-se 60 mL de cada. Frações de aproximadamente 12 mL foram coletadas e a presença do biossurfatante detectada pela leitura de absorbância a 220nm. As frações selecionadas foram reunidas e evaporadas em estufa à 50°C. O biossurfatante purificado obtido foi utilizado para as análises de composição química.

4.5.4 Caracterização química:

4.5.4.1 Cromatografia de camada delgada:

Utilizou-se placa de sílica gel 60 (Merck) aplicando-se amostras do biossurfatante purificado e de surfactina padrão (Sigma), dissolvidas em clorofórmio/metanol (65:15 v/v). Como sistema solvente utilizou-se uma mistura de clorofórmio/metanol/água (65:15:1 v/v). A revelação foi feita com água destilada e aquecimento por 5 minutos a 110°C (Makkar & Cameotra, 1999a)

4.5.4.2 Análise de composição bioquímica:

O conteúdo de proteína do biossurfatante obtido foi determinado pelo método de Biureto (Gornall et al., 1949) e o conteúdo lipídico pelo método de Bligh & Dyer (1959).

4.5.4.3 Análise de aminoácidos:

A composição de aminoácidos do surfatante foi determinada em analisador de aminoácidos (Pickering Laboratotries - USA), após hidrólise da amostra com HCl 6N a 105°C por 24 horas.

4.5.4.4 Espectroscopia de infravermelho:

Amostras do biossurfatante purificado e da surfactina padrão (Sigma) foram submetidas a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier utilizando espectrômetro Perkin Elmer FT-IR modelo Spectrum One. As amostras foram solubilizadas em um pequeno volume de clorofórmio e aplicadas (1 gota) em pastilha dupla de sódio. Após evaporação do solvente em ambiente livre de umidade, o espectro foi gerado entre 500-4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.5.4.5 Espectrometria de massa – ESI :

Foi realizado em espectrômetro de massa tipo quadrupolo “time-of- flight” (TOF) equipado com ionização por eletrospray (ESI) marca Micromass Q-Tof 1. Condições de operação para ESI: gás de dessolvatação (nitrogênio) aquecido a 100°C; o capilar foi mantido em um potencial de 3,5 Kv e a voltagem do cone foi 35Kv. O espectro MS/MS foi gerado

utilizando argônio como gás de colisão sendo a energia de colisão 25eV. As amostras de surfactina padrão (Sigma) e biossurfatante purificado foram dissolvidas em mistura de acetonitrila/água (1:1 v/v) + 0,01% de ácido fórmico para análise em modo positivo. A injeção foi realizada em fluxo de aplicação contínuo de 15 μ L/min.

4.6 Aplicações do biossurfatante obtido:

4.6.1 Atividade emulsificante (E_{24}):

Foi realizada segundo metodologia descrita por Cooper & Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio com tampa rosca foram distribuídos 4 mL de solução aquosa 1mg/mL (do biossurfatante semi-purificado), adicionando-se 6 mL de diferentes hidrocarbonetos a serem testados (hexano, tolueno, decano, querosene, tetradecano, óleo de soja). Cada tubo foi submetido a vortex máximo por 2 minutos deixando-se em repouso por 24 horas. O índice E_{24} foi determinado medindo-se a altura da camada emulsionada (cm) dividindo-se pela altura total de líquido x 100.

4.6.2 Potencial para biorremediação:

A capacidade de remoção de petróleo de areia contaminada foi testada através da saturação de 60g de areia com 5 mL de petróleo. Porções de 20g da areia contaminada foram colocadas em Erlenmeyer de 250 mL adicionando-se 20 mL de água (frasco controle) e 20 mL de solução aquosa 1mg/mL de biossurfatante obtido (frasco teste). Os frascos foram agitados a 150 rpm por 12 horas, a temperatura ambiente. Retirou-se o líquido da primeira lavagem procedendo-se uma segunda adição de 20 mL de água e biossurfatante, incubando-se nas mesmas condições acima. O líquido da segunda lavagem foi removido e a areia foi retirada do frasco sendo colocada em estufa a 50°C até secagem.

4.6.3 Atividade antimicrobiana:

A atividade antibiótica do biossurfatante purificado foi testada contra bactérias e fungos pelo método de difusão em ágar (Barry & Thornsberry, 1991). A solução estoque de

biossurfatante (20µg/µL) foi preparada em mistura de clorofórmio/metanol (65:15 v/v) e aplicada em discos de papel filtro (Whatman 3, diâmetro 0,5 cm). Discos contendo 100µg e 200µg de biossurfatante, bem como um disco controle contendo apenas solvente foram testados. Os discos foram colocados na superfície de meio sólido previamente inoculado com os microrganismos a serem testados. A inibição do crescimento foi medida através do diâmetro dos halos formados ao redor dos discos. Foram testados os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor michei*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum sp*, *Alternaria macrospora*, *Rhizopus oligosporus*, *Fusarium oxisporium*, *Paecilomyces sp.*, *Neurospora sp.*

4.6.4. Atividade antiviral e citotoxicidade:

Visando detectar a presença de atividade antiviral no surfatante produzido, realizaram-se ensaios de inibição da infecção em linhagens celulares com dois tipos de vírus envelopados. O Vírus da estomatite vesicular de bovinos (VSIV) é um vírus de RNA de fita simples com polaridade negativa, pertencente à Família *Rhabdoviridae*, Gênero *Vesiculovirus*, com diâmetro de 60-180 nm e com envelope com espículas de adsorção glicoprotéicas. Também foi utilizado o Vírus da Hepatite Murina (MHV-3), pertencente à Família *Coronaviridae*, que são pleomórficos, com 120-160 nm de diâmetro, e o envelope contém espículas glicoprotéicas. Os vírions apresentam uma única molécula de RNA de fita simples, linear. Testes de infectividade e de inibição da infectividade viral foram realizados “*in vitro*” em sistemas de culturas celulares, tendo sido previamente determinada a possível toxicidade da surfactina sobre as linhagens celulares em uso.

4.6.4.1 Linhagens celulares e vírus:

Foram utilizadas as linhagens celulares BHK-21 (Baby Hamster Kidney) para os testes com VSIV, e L929 (células de tecido alveolar e adiposo de camundongo) para MHV-3. As

células foram mantidas em meio Eagle (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL). As linhagens celulares estabelecidas foram cultivadas por repasses sucessivos em garrafas, com posterior transferência para microplacas de 96 cavidades que foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ e 37°C.

4.6.4.2 Teste de citotoxicidade:

As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 96 cavidades e, após confluência, as monocamadas formadas foram lavadas três vezes com meio Eagle (MEM) e testadas frente ao surfatante, em diferentes concentrações, visando determinar a maior concentração que não levava efeito citotóxico nas células. Uma solução estoque de surfatante em meio Eagle na concentração de 500 µM foi filtrado em membrana 0,22 µm (Millipore) e mantida a -18°C. Esta solução estoque foi diluída em MEM em concentrações que variaram de 100µM a 5µM. Cada uma das concentrações foi testada em triplicata, adicionando-se 50 µL em cada cavidade contendo as monocamadas celulares. A visualização das alterações morfológicas e/ou morte celular foram feitas após 24 horas de incubação a 37°C, com 5% de tensão de CO₂. Os ensaios demonstraram que a concentração de surfatante que não induzia qualquer alteração morfológica nas linhagens celulares testadas foi de 15 µM para BHK-21 e de 12,5µM para L929, sendo estas as concentrações máximas de produto definidas para os testes de atividade antiviral.

4.6.4.3 Ativação dos vírus:

Inicialmente os vírus mantidos congelados a -70°C foram ativados através de cultivos sucessivos em garrafas contendo as monocamadas das respectivas linhagens celulares até a visualização microscópica do efeito citopático característico, ou seja, para VSIV em BHK-21, arredondamento, desprendimento e morte celular e para MHV-3 em L929 a formação de sincícios (grandes estruturas celulares multinucleadas formadas pela fusão

de várias células). Após a visualização do efeito citopático, as monocamadas infectadas foram congeladas e descongeladas e a suspensão viral foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos a 4^o C . O sobrenadante (contendo os vírus) foi dividido em alíquotas de 1 mL e mantido a -70°C. Para determinar os títulos infectantes as partidas ativadas foram diluídas entre 10⁻¹ à 10⁻¹² , em meio MEM, com antibióticos, nas mesmas concentrações, sem soro fetal bovino. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram colocados em quadruplicata sobre monocamadas celulares específicas de cada vírus. A leitura dos testes foi realizada após 24 e 48 horas, para a visualização do efeito citopático viral. Em todos os testes foram incluídos controles da reação, mantendo-se o mesmo número de concavidades apenas com as células em meio MEM. O título viral (TCID₅₀) foi calculado pelo método de Reed & Muench (1938). Para o VSIV ficou determinada a TCID₅₀ /mL de 10^{5,2}. Para o MHV o título capaz de definir 50% de efeito citopático foi de 10^{4,0}.

4.6.4.4. Atividade antiviral:

A atividade do surfatante sobre a infectividade viral foi testada utilizando-se concentrações finais de 15, 14, 13, 12, 11, 10 , 7,5 e 5µM de surfactina. Os vírus foram descongelados, mantidos em banho de gelo e diluídos de modo a obter-se 100TCID₅₀. As monocamadas celulares confluentes foram lavadas por três vezes com meio Eagle (MEM) e sobre elas foram adicionados 50µL da diluição do vírus e 50µL da solução de surfatante nas concentrações acima citadas para o VSIV. Para o MHV-3 utilizou-se 100µL da diluição do vírus e 100µL das soluções de surfatante. Controles das reações foram incluídos, sendo eles: células e vírus, células e as diferentes concentrações de surfatante e apenas células e meio MEM, sem SFB, com antibióticos. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, procedendo-se as leituras em microscópio óptico após 24 e 48 horas. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de microrganismos produtores de biossurfatante em manipueira:

Para a seleção de isolados produtores adotou-se como critério inicial a redução na tensão superficial do meio para níveis inferiores a 30mN/m. Comparou-se os resultados obtidos para os onze isolados em meio basal e meio de manipueira F (Tabela 4). A escolha do meio de manipueira F (sem sólidos insolúveis) foi baseada no trabalho de Santos et al. (1999) que sugeriram que este resíduo poderia ser utilizado para produção de biossurfatantes. Oito isolados reduziram a tensão superficial da manipueira de 46,68 mN/m para valores menores que 30mN/m. Alguns isolados foram capazes de produzir tensão superficial por volta de 30mN/m utilizando meio basal, entretanto, observa-se que a manipueira gerou menor tensão superficial para todos o isolados testados (com exceção do isolado LB6) quando comparado com o meio basal. A tensão superficial média obtida para o meio de manipueira foi de 29,58 mN/m e para o meio basal, de 36,37mN/m. A Figura 4 mostra a percentagem de redução na tensão superficial obtida pelos isolados nos meios testados; a redução média obtida foi de aproximadamente 37% para manipueira e de 22% para o meio basal.

Os isolados LB2a, LB2b, LB5a, LB262 e LBB que produziram os menores valores na tensão superficial (Tabela 4) foram testados para a produção de biossurfatante em dois meios de manipueira: integral (I), com a presença de sólidos insolúveis, e meio F (sem sólidos), com o objetivo de avaliar a capacidade destes isolados em utilizar o resíduo em sua forma natural, i.e., sem o tratamento prévio, o que poderia facilitar o preparo do meio além de reduzir custos.

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para tensão superficial e CMD dos isolados selecionados e da cepa *B. subtilis* ATCC 21332. O meio manipueira F gerou menores valores de tensão superficial e CMD quando comparado à manipueira integral, sugerindo que a presença de sólidos insolúveis interfere na produção de surfatante pelos

isolados testados. Comparando-se os valores de tensão superficial obtidos em manipueira I com os obtidos para o meio basal (Tabela 4), nota-se que o meio de manipueira integral apresentou melhores resultados, constituindo-se em um substrato mais apropriado do que o meio basal para a produção de biossurfatante pelos isolados testados.

Tabela 4. Valores de tensão superficial*(mN/m) obtidos pelos isolados de *Bacillus* sp. em meio basal e em manipueira F.

Isolados	Meios de cultura	
	Basal (mN/m)	Manipueira F (mN/m)
1a	44,40	28,10
2a	41,39	26,05
2b	37,27	26,17
5a	41,21	26,66
B6	32,14	35,06
114	36,91	29,57
115	30,64	30,31
117	30,51	29,66
A	41,89	41,26
B	30,82	26,10
262	32,65	26,48

* desvio padrão máximo 0,20 TS inicial: meio basal 46,75 mN/m; manipueira 46,68mN/m

A CMD (diluição micelar crítica) fornece uma indicação indireta da concentração de surfatante (Makkar & Cameotra, 1997): quanto menor o valor de CMD, maior é a diluição necessária para causar uma mudança significativa na tensão superficial e, portanto, maior é a concentração de surfatante no meio. Os valores de CMD^{-2} apresentados pelos isolados LB2a, LB2b e LB5a em meio manipueira F sugerem que os mesmos produziram maior quantidade de surfatante neste meio do que no meio manipueira I, enquanto que os isolados LBB e LB262 mostraram resultados inferiores aos demais sugerindo menor produção de surfatante.

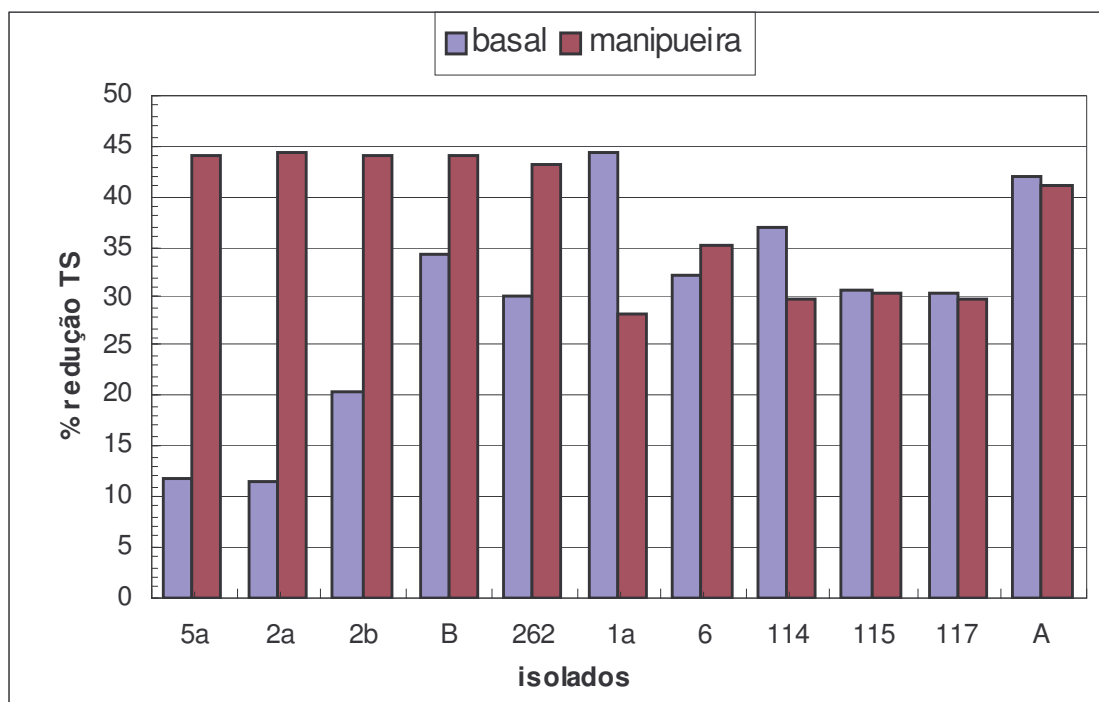


Figura 4. Percentagem de redução na tensão superficial obtida pelos isolados de *Bacillus* em meio basal e manipueira F.

Tabela 5. Valores de tensão superficial* (TS) e diluição micelar crítica (CMD) para isolados de *Bacillus* sp. frente a manipueira integral (I) e sem sólidos (F).

Isolados	Manipueira I			Manipueira F		
	TS (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)	TS (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)
LB2a	30,51	31,95	41,17	26,57	26,85	31,36
LB2b	30,32	31,72	38,70	26,83	27,19	32,57
LB5a	29,02	29,84	36,75	26,95	27,24	33,23
LBB	30,53	31,78	36,89	26,43	29,43	46,49
LB262	30,10	31,10	42,13	26,64	32,01	44,29
ATCC21332	41,56	49,82	68,16	27,93	38,17	58,04

* Desvio padrão máximo 0,20

A cepa *B. subtilis* ATCC 21332 é considerada padrão para a produção de surfactina, um dos mais potentes biossurfatantes conhecidos (Cooper et al.,1981). É interessante notar que a produção de surfatante por *B. subtilis* 21332 em manipueira foi menor (maior TS e CMD), quando comparada com a dos isolados testados (Tabela 5). Este fato sugere uma maior adaptação dos isolados ao substrato manipueira, pois, provavelmente, existem diferenças nas necessidades nutricionais entre estes microrganismos e a cepa 21332. Os isolados foram obtidos de amostras de solo, o que possivelmente os torna mais aptos à utilização de substratos (resíduos) que estão mais disponíveis em seu habitat natural.

A capacidade de crescimento dos isolados em manipueira é mostrada na Tabela 6. A cepa *B. subtilis* 21332 cresceu pouco em ágar manipueira, confirmando os resultados descritos anteriormente. A Figura 5 mostra as placas do isolado LB5a, onde se observa que no ágar manipueira F (placa a) o microrganismo cresceu praticamente em toda a superfície da placa (coloração mais clara) após 24 horas. Em meio de manipueira I (placa b), o diâmetro de crescimento do isolado LB5a foi menor que em manipueira F. No entanto, o isolado *Bacillus* LB5a foi o que apresentou o maior diâmetro de crescimento nos meios de manipueira (Tabela 6), sugerindo sua melhor adaptação ao resíduo.

Tabela 6. Valores de diâmetro de crescimento dos isolados de *Bacillus* em ágar manipueira integral (I) e sem sólidos (F).

Isolados	Diâmetro de crescimento* (cm)	
	manipueira I	manipueira F
LB2a	5,4	3,5
LB2b	5,2	6,3
LB5a	6,5	8,0
LBB	2,4	2,2
LB262	5,2	7,6
ATCC21332	3,3	3,8

* média de duas repetições independentes

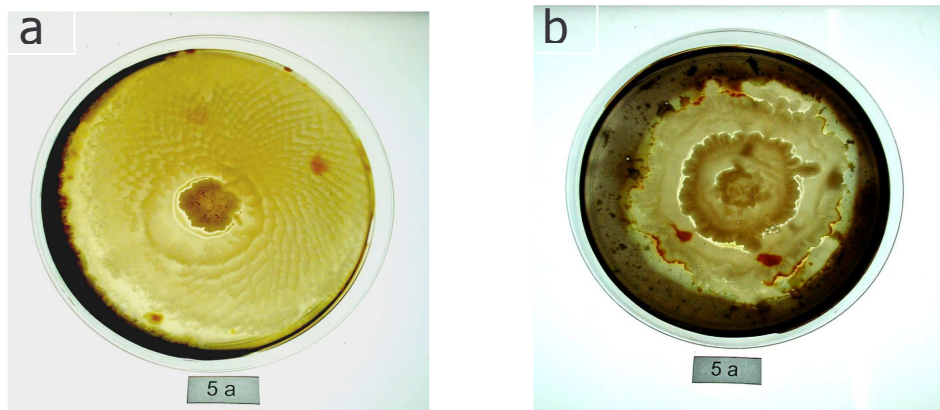


Figura 5. Crescimento do isolado *Bacillus* LB5a em ágar manipueira F (a) e ágar manipueira I (b), após 24 h de cultivo.

Segundo Vater (1986) a produção de surfatante por *Bacillus* está relacionada ao crescimento celular. O crescimento nos meios de manipueira foi utilizado como um critério adicional de seleção, considerando-se que o isolado que apresentasse maior capacidade de adaptação (crescimento) provavelmente também produziria maior quantidade de surfatante. Os resultados das Tabelas 5 e 6 demonstram que o isolado LB5a foi o que apresentou menor tensão superficial e CMD e maior diâmetro de crescimento em ambos os meios testados.

Quando substratos alternativos, como resíduos agroindustriais, são avaliados como meios de cultura é importante considerar as variações de composição que são comuns e naturais neste tipo de subprodutos. Portanto, é muito importante não apenas selecionar microrganismos adaptados a estes substratos bem como buscar linhagens que apresentem maior versatilidade em relação à composição do meio. O isolado LB5a apresentou boa capacidade de crescimento e produção de surfatante, tanto em um meio de manipueira livre de sólidos (F) como em um meio contendo alto teor de sólidos insolúveis (I), o que representa uma vantagem adicional, e ao mesmo tempo, sugere que variações na composição poderão não afetar significativamente a produção de surfatante

por este microrganismo. Levando-se em conta estes aspectos, selecionou-se o isolado *Bacillus* LB5a para condução dos próximos estudos.

5.2 Seleção do meio de manipueira para produção de biossurfatante

Visando definir o tipo de meio de manipueira mais adequado para a produção de biossurfatante por *Bacillus* LB5a foram utilizadas diferentes preparações do resíduo.

Os dados obtidos do cultivo de *Bacillus* LB5a nos meios testados são apresentados na Tabela 7. O microrganismo foi capaz de crescer e produzir biossurfatante em todos os meios de manipueira testados. O crescimento celular foi semelhante em todos os meios e após 24 horas, as células atingiram a fase estacionária. Aproximadamente 80% dos carboidratos totais foram consumidos após 72 horas de cultivo, sendo que para os meios F, F/2, IPS e I/2 a maior parte dos carboidratos (>50%) foi consumida durante as primeiras 24 horas. O meio F por exemplo, teve seu teor de carboidratos reduzido de 30,24 g/L para 8,22 g/L após 24 horas.

Os meios sem sólidos (F e F/2), que possuíam menor concentração de carboidratos, demonstraram menor tensão superficial, enquanto que a maior concentração de carboidratos presente nos meios I e IPS não influenciou significativamente o crescimento celular ou a tensão superficial. O meio F apresentou a tensão superficial mínima de 26,57 mN/m após 24 horas, enquanto que dentre os meios contendo sólidos, a menor tensão superficial foi de 27,5mN/m após 72 horas (IPS). Os valores de CMD obtidos após 72 horas em meio F mostraram CMD^{-1} de 26,92 mN/m e CMD^{-2} de 32,06 mN/m, enquanto para F/2, embora a tensão superficial seja semelhante, os valores de 27,43 mN/m (CMD^{-1}) e 35,82 mN/m (CMD^{-2}) sugerem menor concentração de surfatante. De fato, observa-se que a concentração de biossurfatante bruto obtida em meio F é superior ao F/2 e, conseqüentemente, os valores de CMD foram também menores.

Tabela 7. Comparação do crescimento celular, produção de surfatante, atividade tensoativa e consumo de carboidratos por *B. subtilis* LB5a em diferentes meios de manipueira.

Meio	Tempo (h)	Carboidratos totais (g/L)	Células viáveis (ufc/mL)	Tensão* superficial (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)	Surfatante bruto (g/L)
I	0	43,57	1,0 x 10 ⁷	44,04	54,08	66,49	-
	24	24,65	1,8x10 ⁹	31,57	34,56	48,07	1,23
	48	15,95	1,36x10 ⁹	29,86	31,99	41,04	1,84
	72	9,58	7,0x10 ⁸	29,14	29,66	37,97	1,69
I/2	0	27,93	1,0 x 10 ⁷	46,57	57,06	67,43	-
	24	11,74	1,68x10 ⁹	29,16	31,05	44,09	0,90
	48	6,4	9,8x10 ⁸	29,37	31,22	41,31	1,00
	72	5,50	1,47x10 ⁹	28,13	29,07	36,86	1,36
F	0	30,24	1,0 x 10 ⁷	49,47	54,94	59,45	-
	24	8,22	1,8x10 ⁹	26,57	27,24	34,05	2,34
	48	4,99	9,3x10 ⁸	26,87	27,20	32,42	3,17
	72	4,60	1,32x10 ⁹	26,59	26,92	32,06	2,74
F/2	0	18,24	1,0 x 10 ⁷	51,31	57,42	64,16	-
	24	4,25	4,8x10 ⁸	26,47	27,46	36,38	1,05
	48	4,04	7,1x10 ⁸	26,67	27,43	35,89	1,29
	72	3,44	1,15x10 ⁹	26,63	27,45	35,85	1,32
IPS	0	44,36	1,0 x 10 ⁷	45,24	51,41	59,54	-
	24	15,63	2,25x10 ⁹	29,89	31,48	40,45	1,33
	48	8,92	6,6x10 ⁸	27,9	28,8	36,7	1,81
	72	8,8	1,48x10 ⁹	27,51	27,99	34,74	2,23

* Máximo DP 0.20

Mais de 55% do surfatante foi produzido durante as primeiras 24 horas de cultivo em todos os meios de manipueira (em meio F, por exemplo, 2,34 g/L de um total de 3,17 g/L de surfatante foram produzidas nas primeiras 24 horas) e a tensão superficial atingiu os valores mínimos em torno de 48 horas. Após 24 horas, a síntese de biossurfatante diminuiu e até mesmo uma pequena redução na concentração de produto foi observada após 48 horas (meios I e F). A queda da tensão superficial também ocorreu mais lentamente, o que pode ser visualizado pelos valores de CMD.

A variação na CMC^{-1} obtida para os meios de manipueira testados é mostrada na Figura 6. Observa-se que o meio F apresentou os maiores valores de CMC^{-1} atingindo o máximo de 80 após 48 horas de cultivo, o que representa um valor de CMC de 1,25% (v/v). Os outros meios de manipueira apresentaram valores de CMC^{-1} , inferiores aos obtidos em meio F.

Os resultados demonstraram que a manipueira constituiu-se em um meio de cultura alternativo capaz de suportar o crescimento microbiano e a biossíntese de surfatante. Os carboidratos foram utilizados como fonte de carbono e a concentração de nitrogênio presente parece ser adequada ao crescimento celular. Além disso, os sais minerais (Tabela 3) principalmente ferro e manganês, considerados fatores importantes na produção de surfatantes por *Bacillus* (Cooper et al. 1981), também estão presentes na manipueira.

A avaliação das diferentes preparações de manipueira permitiu concluir que não é necessário diluir o resíduo, pois os meios I/2 e F/2 não apresentaram resultados melhores que os obtidos com as preparações originais (I e F).

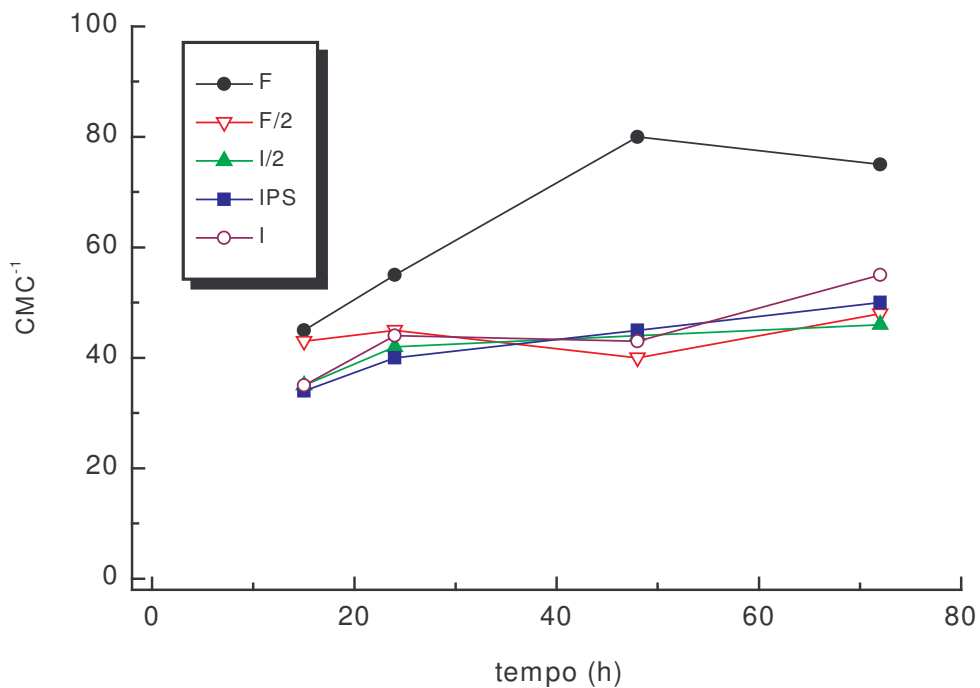


Figura 6. Valores de CMC^{-1} produzidos pelo surfatante de *B. subtilis* LB5a em diferentes meios de manipueira .

Os resultados sugerem que a concentração de sólidos insolúveis (manipueira I, I/2, IPS) é inversamente proporcional à tensão superficial obtida. Possivelmente a presença de sólidos interfere na captação de nutrientes pela célula, influenciando a quantidade e também as características do surfatante produzido, o que se reflete na tensão superficial. Thompson et al. (2000) avaliaram a produção de biossurfatante por *B. subtilis* ATCC 21332 em efluente do processamento de batatas e também observaram que o resíduo contendo alto teor de sólidos gerava concentrações menores de biossurfatante quando comparado ao resíduo com baixo teor de sólidos.

As diferenças no meio de cultivo parecem influenciar as características do tensoativo produzido como se observa pelas curvas de CMC^{-1} . O valor de CMC demonstra diretamente a eficiência de um surfatante, sendo portanto um dos parâmetros mais importantes a serem considerados na escolha de um tensoativo. O surfatante obtido

por *Bacillus* LB5a em manípueira F foi o mais eficiente em relação aos demais. Segundo Sheppard & Mulligan (1987) a composição do meio de cultura tem uma importância crítica na determinação do rendimento e das propriedades dos biossurfatantes produzidos.

Com este estudo foi possível concluir que o meio F foi o mais adequado para produção de surfatante por *Bacillus* LB5a sendo portanto selecionado para a etapa posterior.

5.3 Cinética de produção do biossurfatante

Este estudo teve por objetivo investigar e comparar a cinética de produção de surfatante em meio de manípueira F utilizando a cepa padrão *B. subtilis* ATCC 21332 e o isolado *B. subtilis* LB5a. A cinética de crescimento e produção de surfatante é demonstrada nas Figuras 7 e 8. O consumo de carboidratos e o crescimento celular foram bastante semelhantes para ambos os microrganismos. As culturas atingiram a fase estacionária de crescimento depois de 12 horas de cultivo.

O pH do meio da cepa 21332 aumentou inicialmente e ao final do cultivo diminuiu para valores ao redor de 7,0-7,6, enquanto que LB5a apresentou um aumento no pH do meio que foi mantido entre 7,5- 8,0 na etapa final de cultivo.

A tensão superficial mínima de 25,9 mN/m foi obtida depois de 24 horas para a cepa 21332, enquanto que para LB5a a tensão superficial mínima de 26,6 mN/m foi observada após 12 horas de cultivo.

B. subtilis 21332 produziu 2,2 g/L de surfatante após 36 horas de cultivo e *B. subtilis* LB5a 3,0 g/L de surfatante após 48 horas. A maior parte do surfatante foi produzida após 12 horas por *B. subtilis* 21332. Entretanto, para o isolado LB5a, 50% da síntese ocorreu durante as primeiras 12 horas de cultivo. A queda drástica na concentração de biossurfatante observada para a cepa 21332 foi também acompanhada por alterações nos parâmetros de atividade tensoativa, ou seja, aumento na tensão superficial e CMD e redução na CMC^{-1} (Figura 8).

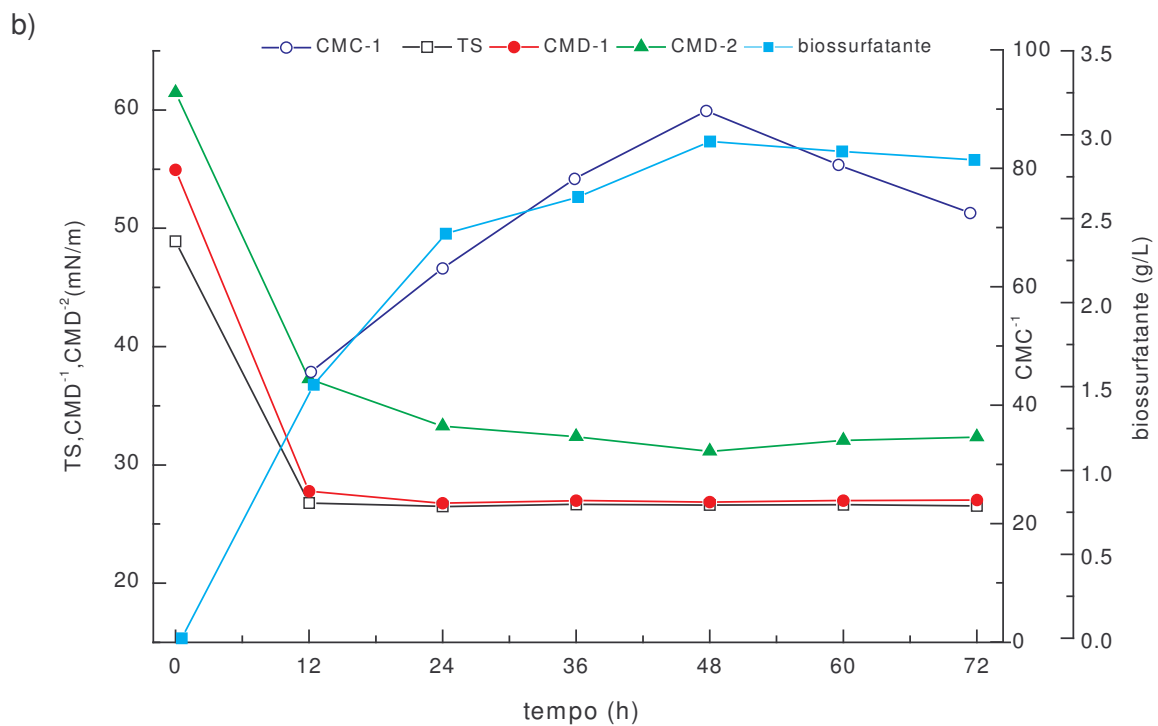
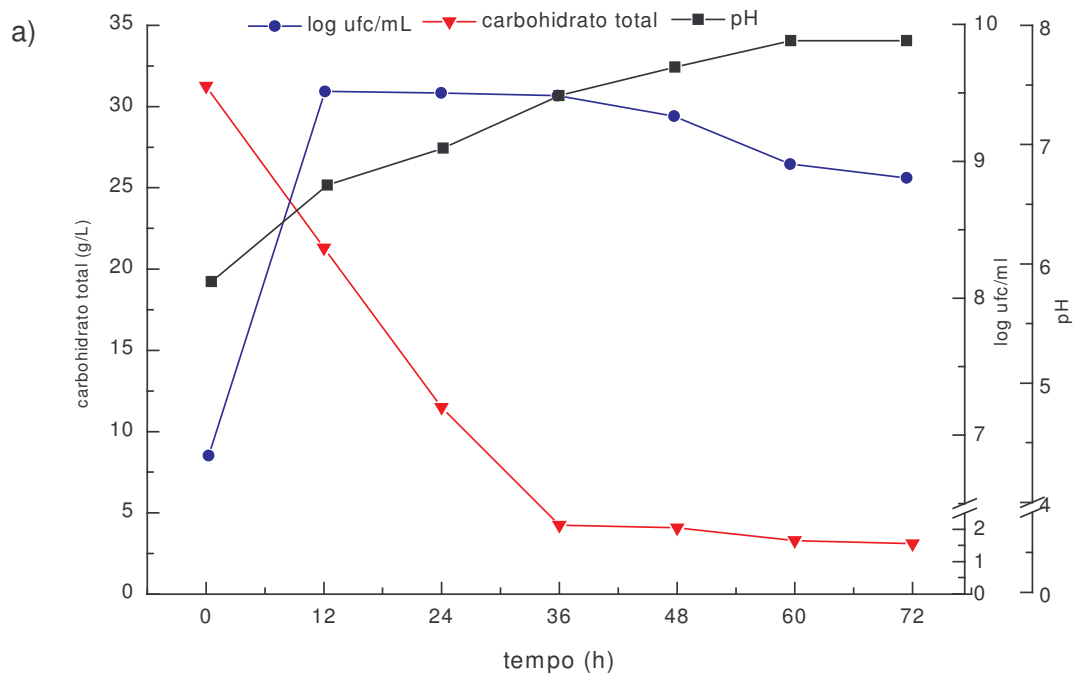


Figura 7. Cinética de produção de surfatante por *B. subtilis* LB5a em manipulera F. a) Crescimento celular, consumo de carbohidratos e pH b) atividade tensoativa e concentração de biosurfatante.

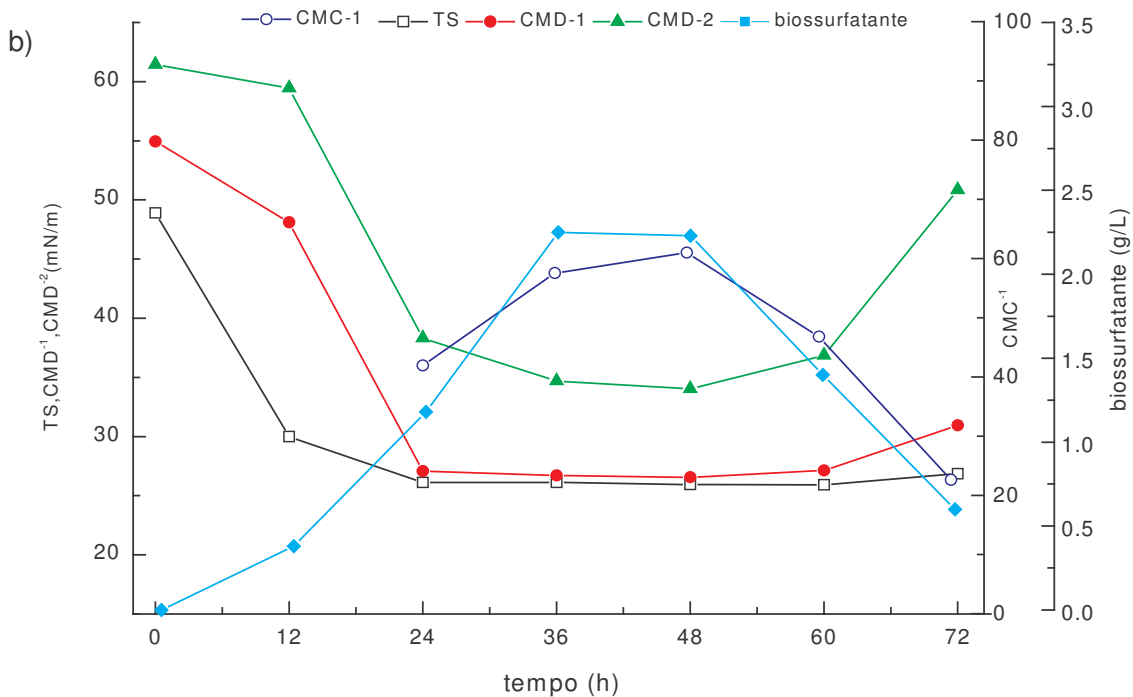
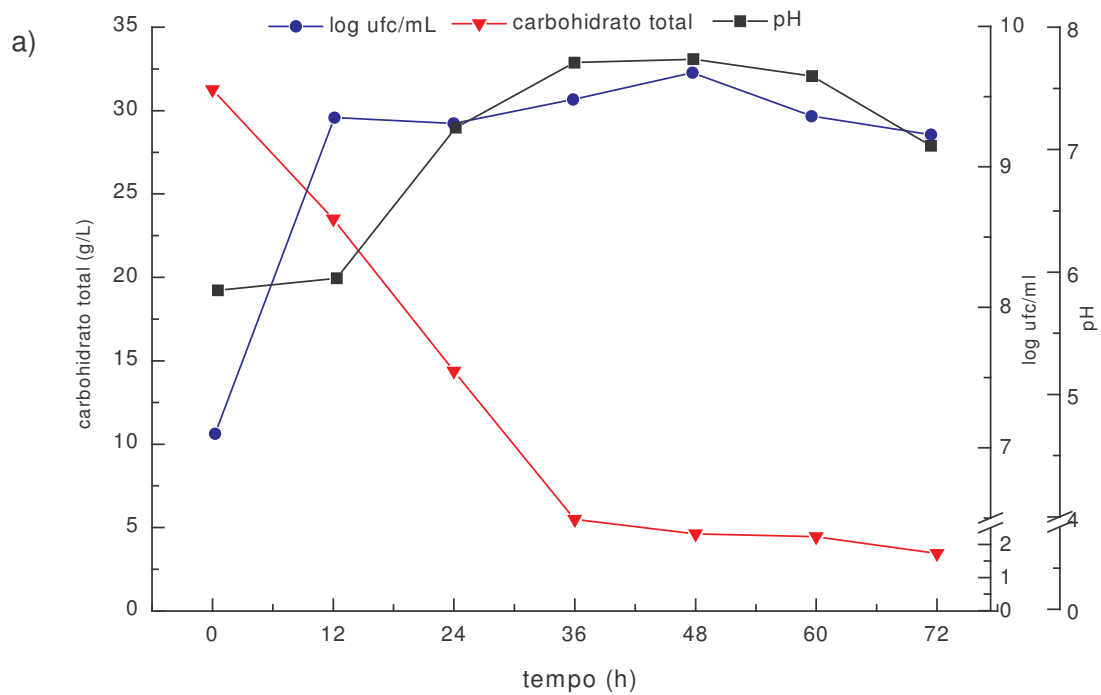


Figura 8. Cinética de produção de surfatante por *B. subtilis* 21332 em manipueira F. a) Crescimento celular, consumo de carbohidratos e pH b) atividade tensoativa e concentração de biossurfactante.

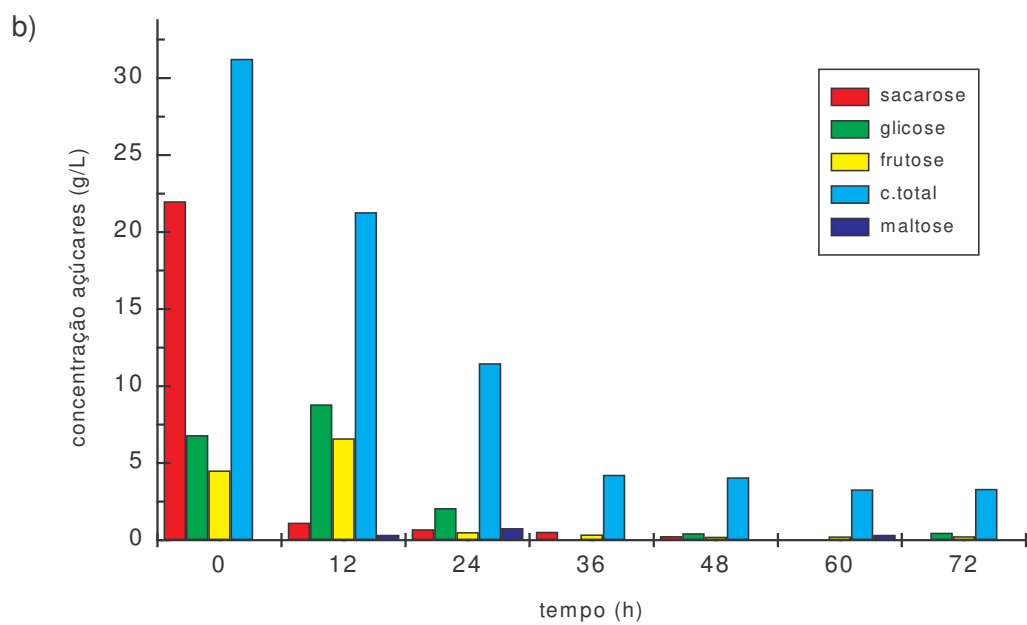
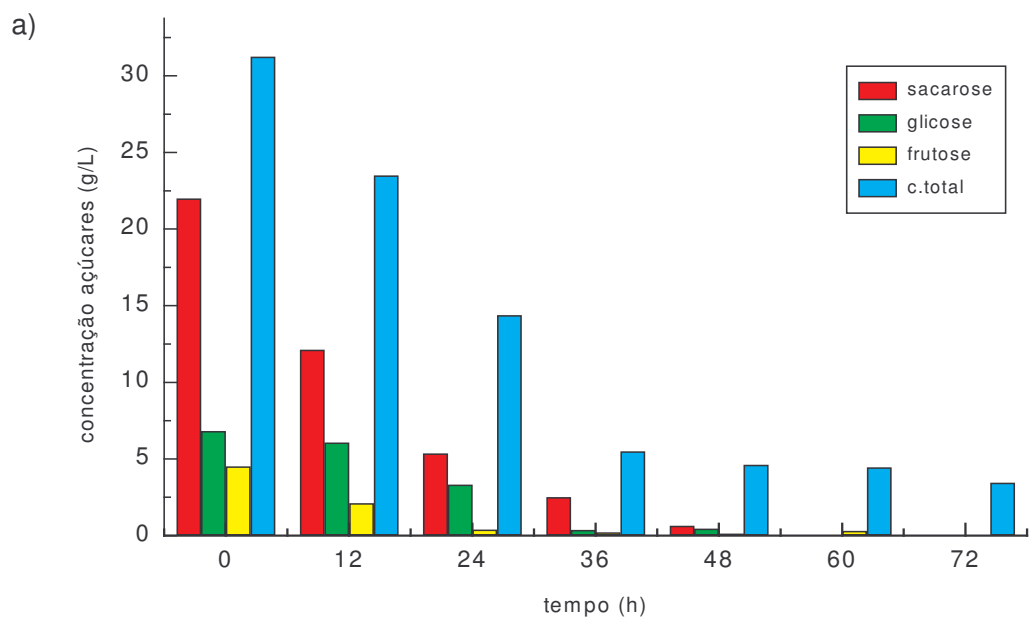


Figura 9. Perfil do consumo de carboidratos pela cepas de *B. subtilis* ATCC 21332 (a) e *B. subtilis* LB5a (b) em meio manipueira F.

O principal carboidrato presente na manipueira é a sacarose, sendo que frutose e glicose também estão presentes em quantidades significativas (Figura 9), fato que também foi evidenciado em trabalhos anteriores (Damasceno, 1999). O decréscimo na concentração de sacarose e conseqüente aumento de glicose e frutose observados inicialmente, se devem à hidrólise da molécula de sacarose. A sacarose foi consumida totalmente em 48 horas e observa-se que o isolado LB5a consumiu a sacarose mais rapidamente em comparação com a cepa 21332. A presença de maltose (LB5a) e glicose na fase tardia de cultivo sugere hidrólise enzimática de amido ou dextrinas, embora o amido solúvel estivesse presente em pequena concentração (0,4 g/L). Thompson et al. (2000) relataram que *B. subtilis* 21332 expressou uma α -amilase, que permitiu a utilização de um resíduo rico em amido de batata para a produção de biossurfatante. De acordo com Sandrin et al. (1990), glicose, frutose e sacarose são as melhores fontes de carbono para a síntese de surfactina; e todos estes açúcares também estão presentes na manipueira (Figura 9).

A Figura 10 mostra a correlação entre a concentração de surfatante e a produção de protease pela cepa *B. subtilis* 21332 em manipueira F. A atividade enzimática presente no meio de cultura mostrou um aumento de 0,2 U/mL em 36 horas para 1,03 U/mL em 72 horas (5,15 x) e simultaneamente a concentração de surfatante diminuiu de 2,2 g/L para 0,6 g/L (73% redução).

Para evidenciar a ação da protease de *B. subtilis* 21332 sobre a molécula de biossurfatante, testou-se o efeito da adição do surfatante do isolado LB5a, no meio de cultura de 72 horas da cepa 21332 (Tabela 8). Quando o surfatante foi adicionado, a atividade tensoativa obviamente foi reduzida (tempo zero) entretanto, após 24 horas de incubação a 30 °C e 150 rpm, a tensão superficial e o CMD aumentaram. O CMD⁻² aumentou de 33,01 mN/m para 48,93 mN/m após 24 horas, atingindo praticamente o mesmo valor inicial do meio controle sem adição de surfatante.

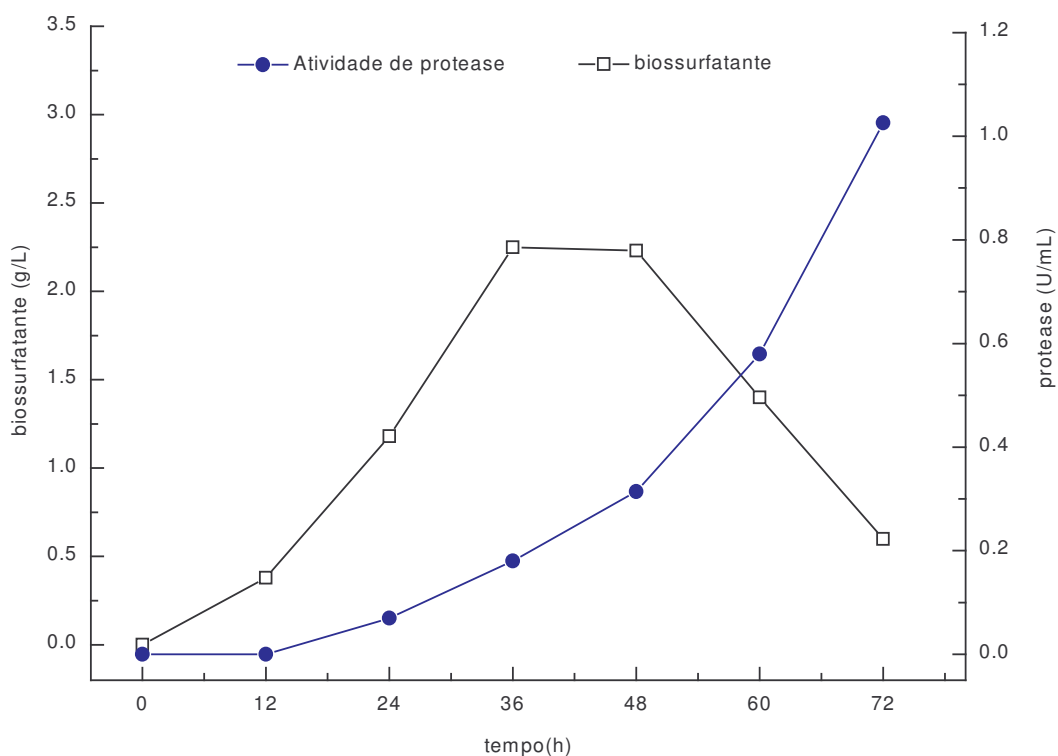


Figura 10. Atividade de protease e produção de surfatante por *B. subtilis* 21332 em manipeira F.

Kim et al. (1997) observaram uma relação direta entre crescimento celular, produção de surfatante e consumo de carboidratos quando *B. subtilis* C9 era cultivado em meio sintético. A biossíntese de surfatante pelos microrganismos aqui testados apresentou algumas diferenças. *B. subtilis* LB5a acumulou surfatante durante a fase exponencial e estacionária de crescimento, como foi previamente descrito para outras cepas de *Bacillus* (Vater, 1986). Pelos resultados obtidos, não se pode afirmar que a produção de surfatante está associada ao crescimento uma vez que 50% do produto foi sintetizado na fase estacionária de crescimento.

Tabela 8. Efeito da adição de surfatante de LB5a no meio de cultura de *B.subtilis* 21332.

Amostras*	Atividade tensoativa (mN/m)		
	TS	CMD ⁻¹	CMD ⁻²
meio (controle)	26.01	27.91	48.48
meio + 20 µg surfatante ^a (0 h)	25.91	26.60	33.01
meio + 20 µg surfatante (24 h)	26.38	29.55	48.93

* 15 mL de meio de *B. subtilis* 21332 após 72 h de cultivo

^a surfatante de *B. subtilis* LB5a TS (tensão superficial) CMD (diluição micelar crítica)

No caso de *B. subtilis* 213332, a maior parte do surfatante foi sintetizada durante a fase estacionária, indicando que a produção do biossurfatante não está diretamente relacionada com o crescimento celular. Em estudos anteriores Sheppard & Mulligan (1987) relataram que a produção de surfactina por *B. subtilis* 21332 ocorria principalmente a partir do final da fase exponencial de crescimento, o que também foi observado neste trabalho.

A tensão superficial mínima foi atingida após 12 horas (isolado LB5a) e 24 horas (cepa 21332), portanto, nestes tempos de cultivo a concentração de surfatante presente já se encontrava acima da CMC e um aumento na concentração de biossurfatante produzido não reduziria mais a tensão superficial. Os valores de CMD, principalmente CMD⁻², refletem mais claramente as variações na concentração de biossurfatante (Figuras 7 e 8).

Davis et al. (1999) relataram que quando ocorria a exaustão de nutrientes no cultivo de *B. subtilis* 21332 (fase final de cultivo), a concentração de surfactina no meio se mantinha aproximadamente constante. Um comportamento semelhante foi observado para o isolado *B. subtilis* LB5a em meio de manipueira até 48 horas. Entretanto, a redução na concentração de surfatante demonstrada para *B. subtilis* 21332 em manipueira sugere que ocorreu a degradação do produto.

Wei & Chu (1998) observaram uma queda nos níveis de surfactina quando da adição de ferro ao meio de cultura de *B. subtilis* 21332, porém o decréscimo se devia à

acidificação do meio, que provocava a precipitação do surfatante. No caso da manipueira, quando a concentração de surfatante diminuiu, o pH estava em torno de 7,0 e nenhuma precipitação foi observada. As mudanças observadas nos parâmetros de atividade superficial reforçam a idéia de degradação do surfatante.

Sabe-se que microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* são capazes de produzir proteases (Anwar & Saleemudin, 1998). Considerando a crescente atividade proteolítica observada no meio de cultura de *B. subtilis* 21332 (Figura 10) conclui-se que a queda na concentração de surfatante provavelmente está relacionada à ação enzimática. A hidrólise enzimática da surfactina foi descrita pela primeira vez por Grangemard et al. (1999) utilizando uma endoprotease produzida por *Staphylococcus aureus*. Segundo os autores, a enzima atuava sobre a porção peptídica do surfatante, gerando um lipopeptídeo de cadeia aberta.

Observando os valores de atividade superficial da Tabela 8, pode-se notar que a concentração de surfatante de *B. subtilis* LB5a diminuiu quando adicionado ao meio de *B. subtilis* 21332, provavelmente devido à ação enzimática sobre a molécula do biossurfatante. A cepa *B. subtilis* 21332 parece ser capaz de expressar uma protease que atua sobre o seu produto (surfatante). Uma possível explicação seria que quando a concentração de surfatante atinge certos níveis, esta causa algum efeito tóxico sobre as células bacterianas e o microrganismo degrada o surfatante para evitar a inibição no crescimento e a sua própria morte. De fato, alguns autores descreveram que a produção de surfactina por *B. subtilis* 21332 pode ser inibida pelo produto final (Sen, 1997; Cooper et al., 1981).

Outra razão para o consumo do produto final poderia ser a necessidade energética das células. A hidrólise enzimática poderia suprir alguns nutrientes necessários para a manutenção do microrganismo. Um declínio drástico na concentração de surfatante não foi observado em *B. subtilis* LB5a, embora a atividade de protease tenha atingido valores

de 5,3U/mL; esse fato sugere que a protease de *B. subtilis* 21332 é provavelmente diferente daquela do isolado LB5a.

Embora a produção de proteases por *B. subtilis* seja bastante conhecida, a degradação enzimática da surfactina em meio de cultivo nunca foi relatada. Esse fato pode estar relacionado ao meio de manipueira, ou seja, algum componente presente poderia estimular a produção de uma protease específica por *B. subtilis* 21332. A exaustão de determinado nutriente essencial do meio de manipueira poderia também estimular a bactéria a produzir uma enzima que hidrolisaria a molécula de surfatante e a utilizaria como substrato.

A protease produzida por *B. subtilis* 21332 em manipueira deve ser identificada, purificada e caracterizada, pois enzimas que atuam sobre lipopeptídeos, como por exemplo a surfactina, podem ser ferramentas muito úteis na modificação estrutural destes compostos e, conseqüentemente, gerar moléculas com características físico-químicas e biológicas distintas.

Comparando-se a concentração de biossurfatante bruto produzida por *B. subtilis* LB5a em manipueira com os valores obtidos por *B. subtilis* em outros tipos de resíduos observa-se que os resultados são similares aos obtidos por Thompson et al. (2000), que observaram uma concentração máxima de 3,6 g/L em resíduo de batata com baixo teor de sólidos. Já para meio suplementado com melaço os valores ficaram entre 0,4-1,0 g/L (Makkar & Cameotra, 1997) e, para água de turfa, o valor máximo de CMC^{-1} obtido foi de 70. Para manipueira obteve-se CMC^{-1} de 90 e uma concentração de 3,0 g/L.

O estudo cinético revelou que o isolado *B. subtilis* LB5a possui características diferenciadas em relação à cepa padrão ATCC 21332 quanto à produção de surfatante em manipueira. Além de acumular maior quantidade de tensoativo com maior CMC^{-1} (mais eficiente), não foi evidenciada degradação do produto final quando o isolado LB5a foi cultivado em meio de manipueira; sendo, portanto, o isolado LB5a mais adequado para

a utilização do substrato alternativo proposto. A produção de surfatante pela cepa padrão em meio de manipueira poderia ser realizada, desde que o tempo de cultivo fosse controlado, para se evitar a perda do produto ao final do processo. Através do estudo cinético determinou-se que o tempo de cultivo adequado para o isolado LB5a era de 48 horas nas condições estabelecidas. Todos os estudos posteriores foram realizados em meio de cultivo de 48 horas.

5.4 Caracterização quanto às propriedades e composição química

Neste estudo o biossurfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira F foi caracterizado quanto às suas propriedades e estrutura química. A avaliação da estabilidade do surfatante produzido pelo isolado LB5a foi realizada frente a variações de pH, força iônica e extremos de temperatura.

O efeito do tratamento térmico (Figura 11) não demonstrou mudanças significativas na atividade tensoativa do meio. A tensão superficial e CMD permaneceram estáveis mesmo após 2 horas de exposição a altas temperaturas (100°C). Quando o meio foi submetido à esterilização em autoclave (121°C/15 minutos), a atividade tensoativa também foi mantida. Os valores de tensão e CMD também se mantiveram estáveis após seis meses a -18°C.

O efeito do pH sobre o biossurfatante é mostrado na Figura 12. A atividade tensoativa foi mantida na faixa de pH de 5 a 11, com pequena variação na tensão superficial e CMD^{-1} porém, o CMD^{-2} apresentou um aumento gradual na tensão superficial à medida em que aumentaram os valores de pH. Para valores de pH menores que 5,0 a atividade tensoativa aumenta consideravelmente devido a precipitação do surfatante do meio ou seja, o pH ácido não afetou a estabilidade do surfatante, mas sim a sua solubilidade.

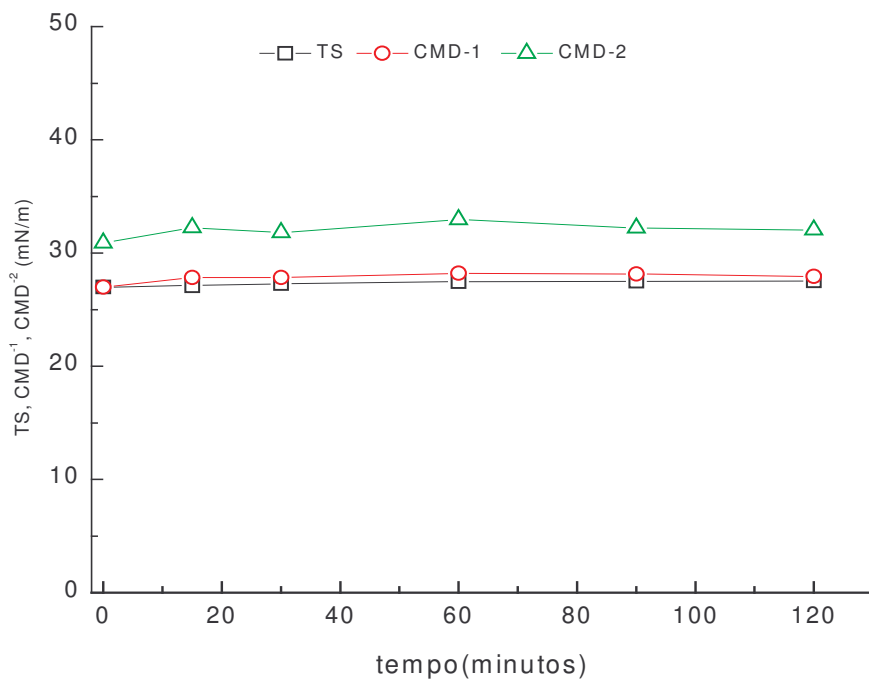


Figura 11. Efeito da temperatura (100°C) sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira.

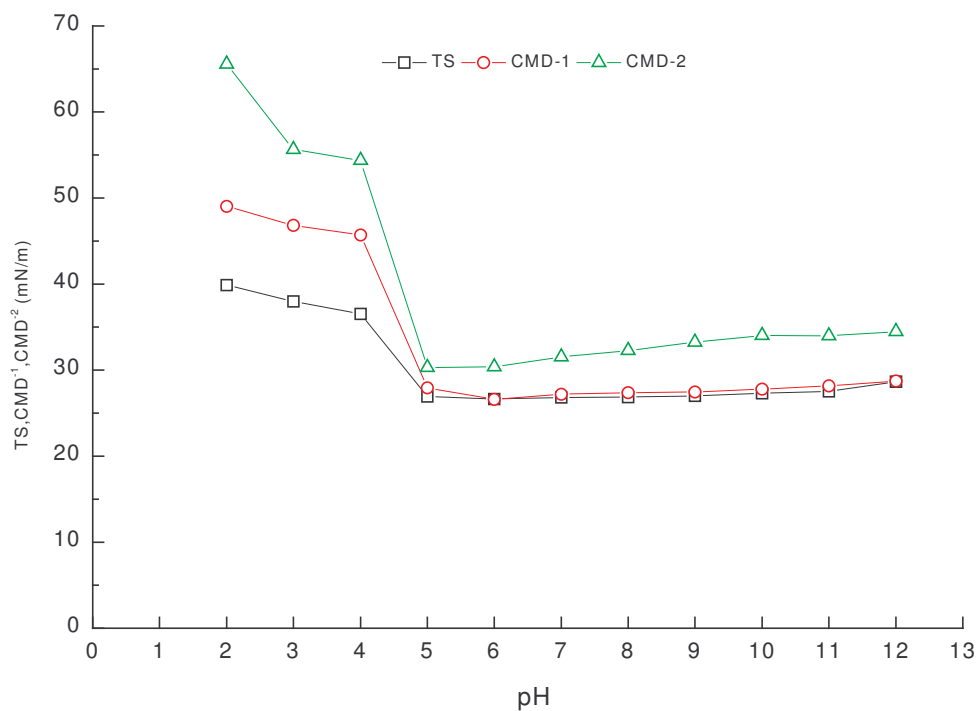


Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira.

A Figura 13 mostra o efeito da adição de sal na atividade tensoativa do surfatante. Pequenas alterações foram evidenciadas na tensão superficial e CMD com a adição de até 20% (m/v) de cloreto de sódio.

A tensão superficial mínima em manipueira foi de 26,6 mN/m e a tensão interfacial do meio contra hexadecano (após 48 horas de cultivo) foi de 0,97 mN/m.

A análise bioquímica preliminar revelou que o biossurfatante de *B. subtilis* LB5a possuía 53,6% de lipídeos e 38,5% de proteínas, caracterizando-o como um lipopeptídeo. A concentração micelar crítica (CMC) estimada foi de 33 mg/L. A composição de aminoácidos indicou a presença de ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina na relação molar 1,0:1,0:1,2:3,4.

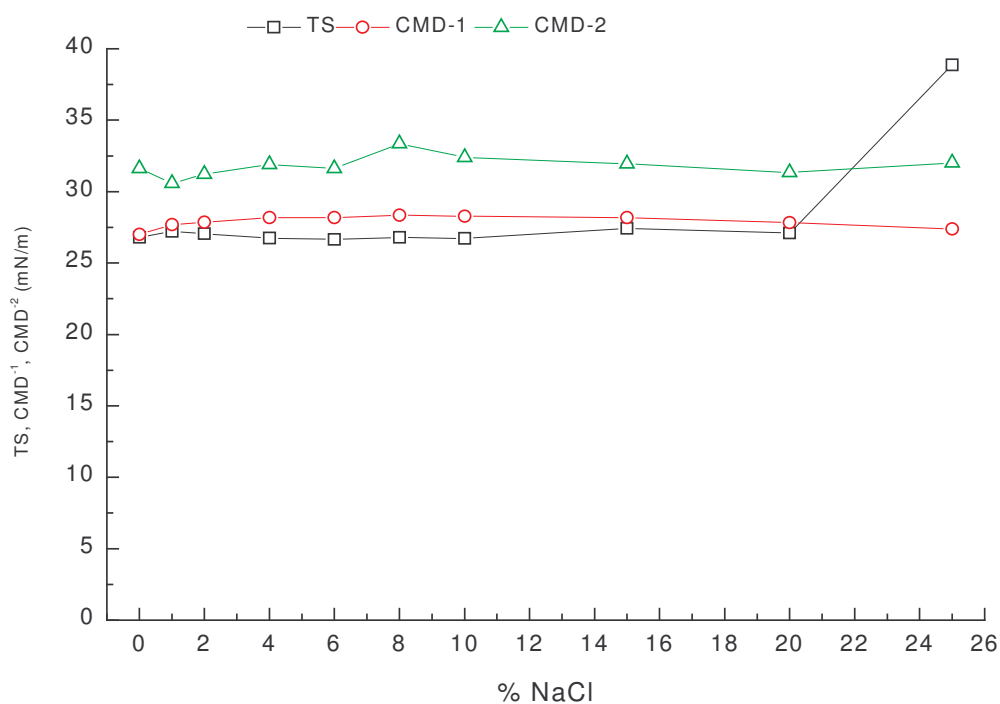


Figura 13. Efeito da força iônica sobre a atividade tensoativa do surfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira.

A caracterização preliminar por cromatografia de camada delgada revelou que o biossurfatante de *B. subtilis* LB5a apresentou uma mancha com fator de retenção (Rf) de 0,56 enquanto que o padrão de surfactina (Sigma) apresentou uma mancha com Rf de 0,55 (Figura 14). Também se observou uma mancha que não está presente no padrão e que provavelmente se deve à presença de impurezas na amostra.



Figura 14. Cromatografia em camada delgada do padrão de surfactina e da amostra semi-purificada do surfatante obtido por *B. subtilis* LB5a em manipueira.

A surfactina, um dos mais potentes biossurfatantes já conhecidos, apresenta tensão superficial ao redor de 25,0 mN/m, tensão interfacial menor que 1,0 mN/m e CMC de 25 mg/L (Cooper et al., 1981). O surfatante obtido em manipueira por *B. subtilis* LB5a demonstrou uma tensão superficial de 26,6 mN/m, tensão interfacial de 0,96 mN/m e um CMC de 33 mg/L, o que caracteriza este produto como um poderoso agente tensoativo.

É importante verificar as características e propriedades do surfatante obtido em manipueira uma vez que a composição do meio de cultivo (balanço de nutrientes) influencia diretamente esses parâmetros (Sheppard & Mulligan, 1987).

Os ensaios em meio de cultura demonstraram que o biossurfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira possui estabilidade térmica, estabilidade em pH acima de 5,0 e tolerância à presença de sal em até 20%. Estes resultados sugerem que o produto obtido pode ser útil em situações onde condições extremas de temperatura, pH e salinidade estão presentes, como por exemplo, na recuperação melhorada de petróleo e na biorremediação de solos e ambientes marinhos.

O biossurfatante obtido demonstrou excelentes propriedades tensoativas, reduzindo tensão superficial e interfacial para níveis comparáveis aos melhores surfatantes, e exibindo baixo valor de CMC e elevada estabilidade térmica, além de relativa estabilidade a pH e força iônica. A caracterização preliminar revelou que o surfatante é um lipopeptídeo, com composição de aminoácidos muito semelhante à surfactina (Kakinuma et al., 1969).

As cepas de *B. subtilis* são conhecidas pela capacidade de produzir diversos tipos de lipopeptídeos, particularmente iturina, surfactina e fengicina. Algumas cepas produzem apenas um tipo de lipopeptídeo, enquanto outras produzem dois ou mais tipos de moléculas simultaneamente (Sandrin et al., 1990). A produção destes lipopeptídeos é dependente da composição do meio de cultura (Akpa et al., 2001). A elucidação da estrutura do surfatante produzido em substratos alternativos se faz necessária porque as propriedades tensoativas e biológicas dos lipopeptídeos dependem da sua composição química (Besson & Michel, 1992), que é influenciada pela composição do meio e pelas condições de cultivo. Para definir o tipo de surfatante obtido em manipueira procederam-se análises mais detalhadas da composição do produto.

A Figura 15 mostra o espectro infravermelho do surfatante obtido, onde se observam bandas características de peptídeos a 3298 cm^{-1} (A) resultante do estiramento da ligação N-H. Em 1652 cm^{-1} (F), observa-se o estiramento da ligação C=O e em 1559 cm^{-1} (G) a deformação angular de NH combinado com o estiramento da ligação C-N. As bandas de absorção nas frequências de 2958 a 2850 cm^{-1} (B-C-D) e 1467 a 1380 cm^{-1} (H-I) se devem a cadeias alifáticas. A banda em 1734 cm^{-1} (E) refere-se à absorção de grupo carbonil de anel lactona. Estes resultados indicam que a amostra analisada contém cadeia alifática bem como uma porção peptídica. A Figura 16 mostra a sobreposição dos espectros de infravermelho da amostra e do padrão de surfactina.

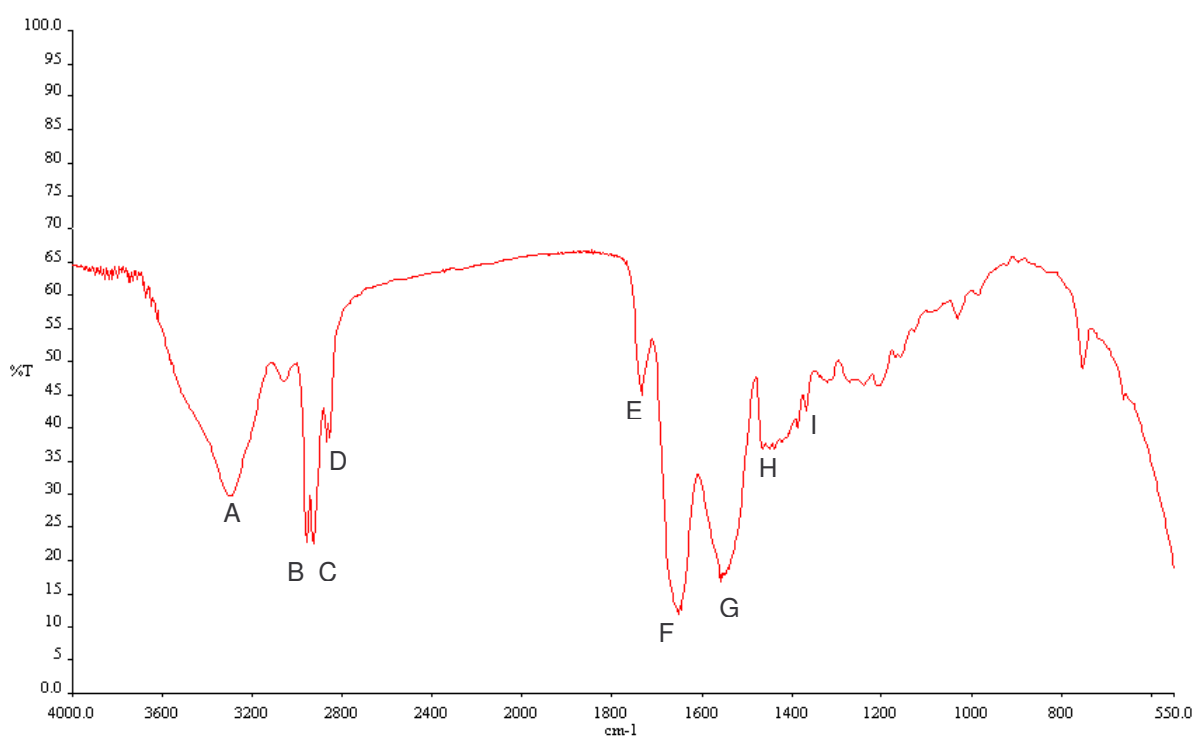


Figura 15. Espectro infravermelho da amostra de biossurfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira F. As letras (A-I) representam as bandas descritas no texto.

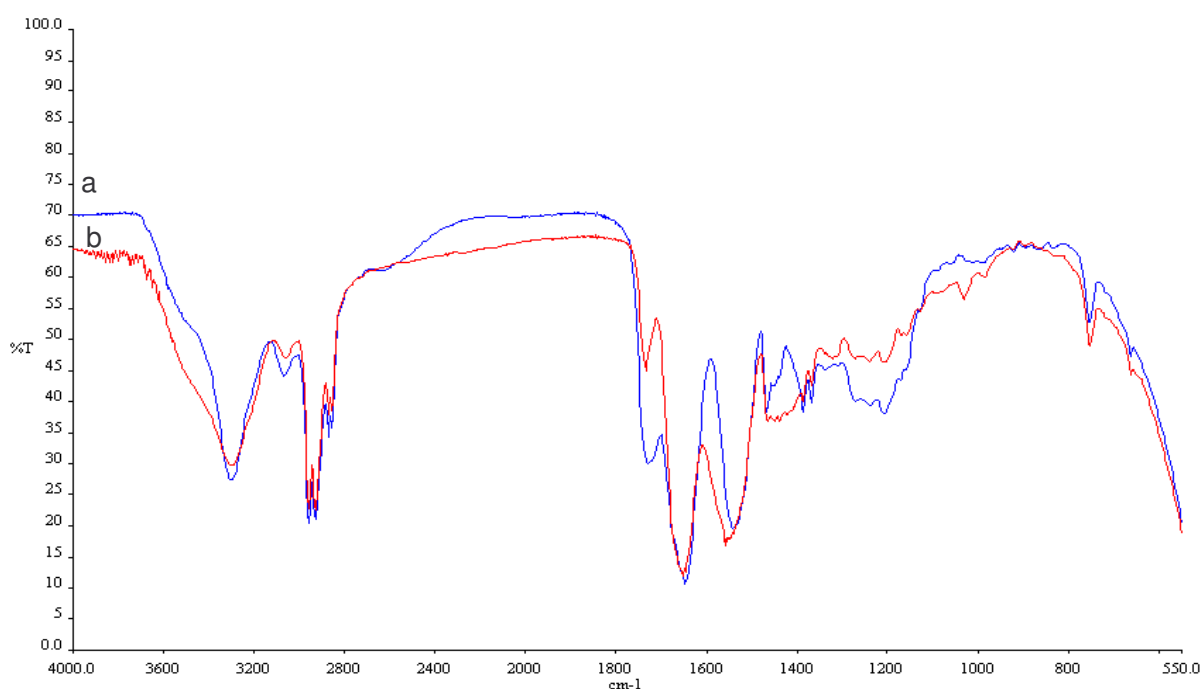


Figura 16. Comparação dos espectros de infravermelho do padrão de surfactina (a) e amostra de biosurfatante de *B. subtilis* LB5a (b).

Na Figura 17 são apresentados os espectros de massa da amostra e do padrão de surfactina. O espectro ESI do biosurfatante (M) revelou a presença de moléculas protonadas $[M+H]^+$ de m/z 1008, 1022 e 1036 e seus adutos de sódio $[M+Na]^+$ de m/z 1030, 1044, 1058 e potássio $[M+K]^+$ de m/z 1046, 1060 e 1074. Os íons de m/z 1034, 1041, 1048 e 1055, foram identificados como dímeros homogêneos ou mistos, duplamente carregados, ou seja, adicionados de próton e cátions de sódio ou potássio: $[2M+Na(K)+H]^+$ ou $[MM'+Na(K)+H]^+$. A intensidade relativa dos íons reflete a composição percentual de cada molécula nas amostras analisadas. As moléculas de massa 1021, 1035 e 1047 foram os íons predominantes na amostra de biosurfatante sendo que a forma mais abundante foi a de m/z 1036, a qual corresponde a forma protonada do lipopeptídeo com 15 carbonos na cadeia lipídica. Os outros íons cuja m/z varia em 14 unidades abaixo (1008 e 1022) representam os homólogos com 13 e 14 carbonos na cadeia de ácidos graxos. Os dímeros foram formados por diferentes combinações de

duas moléculas dos íons predominantes (1008, 1022, 1036), e a provável causa da sua formação foi a presença de sais na amostra analisada.

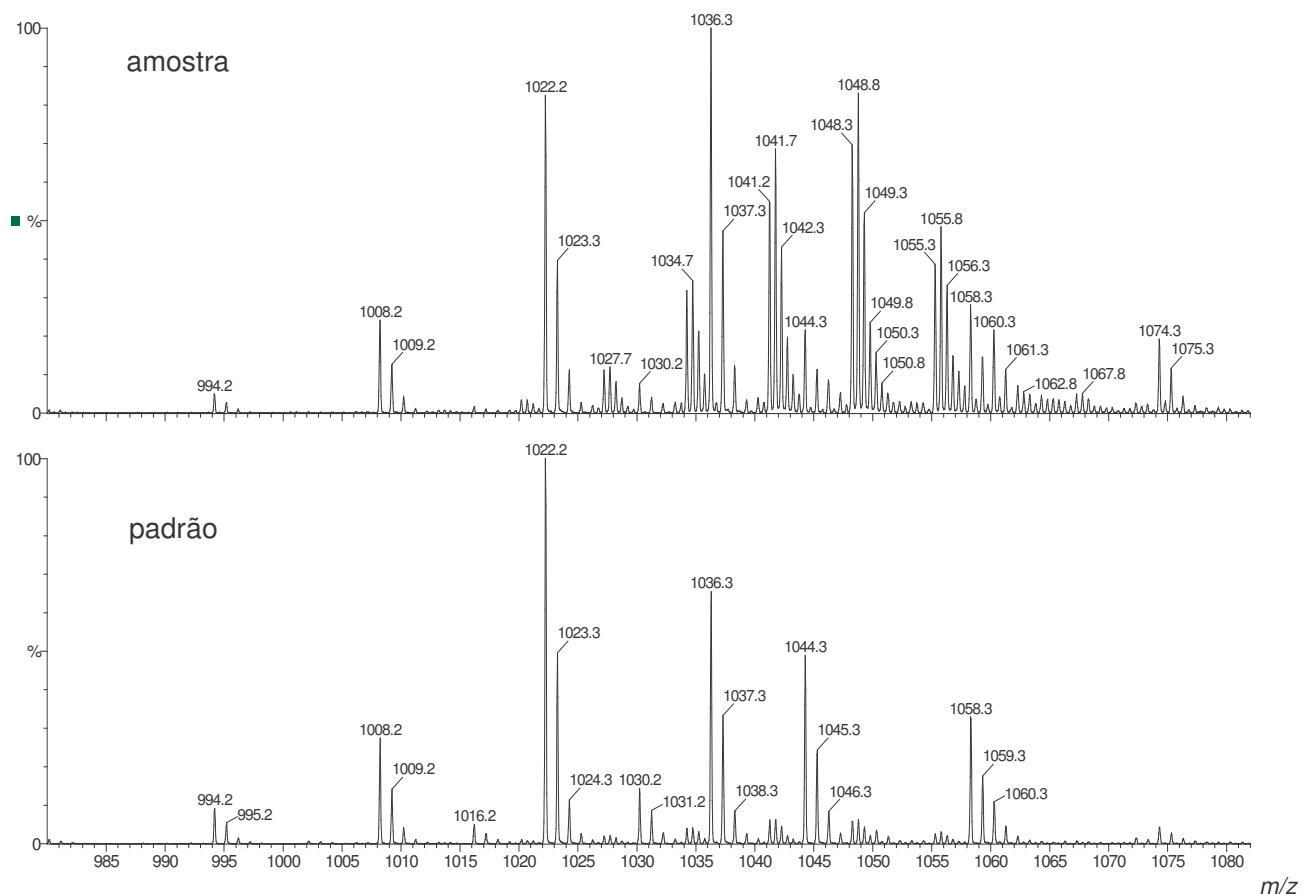


Figura 17. Espectrometria de massas (ESI) da amostra de surfatante obtida por *B. subtilis* LB5a em manipueira e do padrão comercial de surfactina.

A preparação comercial (padrão) de surfactina foi igualmente analisada e o espectro de massas ESI se revelou muito semelhante ao obtido para a amostra de *B. subtilis* LB5a (Figura 17), demonstrando a presença de dois íons principais $[M+H]^+$ de m/z 1022 e 1036. Os padrões de fragmentação destes íons em ESI-MS/MS foram idênticos aos observados para a amostra de surfatante produzida pelo isolado LB5a em manipueira. A presença de dímeros no padrão é menos abundante que na amostra, possivelmente pelo maior grau de purificação do mesmo. Nota-se, ainda, que no padrão predomina a

molécula protonada de m/z 1022 (homólogo de 14 carbonos) enquanto que no surfatante produzido neste trabalho a forma predominante é a molécula protonada de m/z 1036 (15 carbonos).

A seqüência de aminoácidos da cadeia peptídica da amostra de surfatante foi deduzida a partir da interpretação do espectro ESI-MS/MS dos principais íons precursores (m/z 1036, 1022, 1008). A Figura 18 mostra a fragmentação do íon de m/z 1036 assumindo clivagem preferencial do anel na posição da lactona; sete resíduos de aminoácidos foram detectados na seqüência Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu. Esta mesma seqüência também foi deduzida a partir da análise dos outros homólogos em suas formas protonadas.

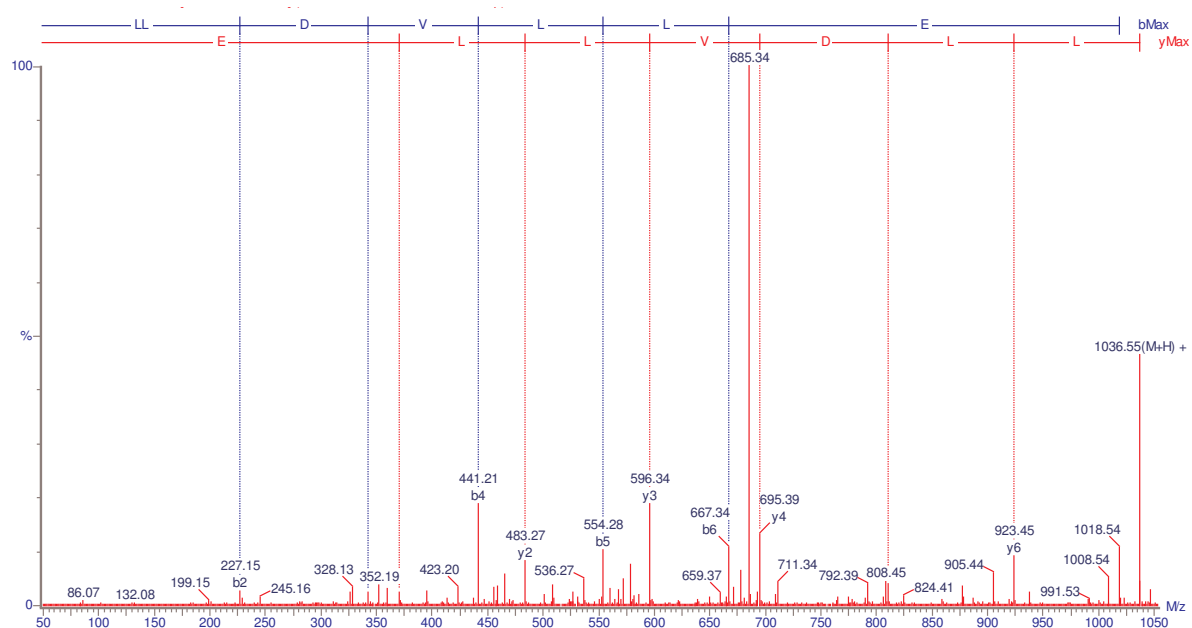


Figura 18. Fragmentação (ESI-MS/MS) do íon de m/z 1036. Os fragmentos e os aminoácidos correspondentes são mostrados nas linhas pontilhadas.

O espectro infravermelho do biossurfatante revelou a presença de cadeias alifáticas, peptídeos e anel lactona. A presença dos resíduos de ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina na proporção 1,0:1,0:1,2:3,4 foram confirmados através da fragmentação

dos íons precursores, estando presentes na seqüência RO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, formando um heptapeptídeo como previamente descrito para surfactina (Kakinuma et al., 1969).

O espectro de massa demonstrou a predominância de uma molécula protonada de m/z 1036 o qual representa o lipopeptídeo de 15 carbonos na cadeia lipídica, que corresponde à isoforma chamada de surfactina D (Oka et al., 1993). A análise do padrão de surfactina (Sigma) demonstrou uma distribuição de massas moleculares e uma seqüência de aminoácidos dos principais íons idêntica aos obtidos na amostra. Portanto, conclui-se que o biossurfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira é o lipopeptídeo surfactina.

A co-produção de outros tipos de lipopeptídeos (iturinas, fengicinas) não foi detectada, sugerindo que *B. subtilis* LB5a produz somente um tipo de lipopeptídeo em manipueira. Este fato pode representar uma vantagem por reduzir os problemas relacionados à purificação do produto.

5.5 Aplicações do biossurfatante obtido:

Para investigar possíveis aplicações do biossurfatante obtido por *B. subtilis* LB5a em manipueira, procederam-se estudos de atividade emulsificante, potencial para biorremediação e atividade biológica. Em adição à tensão superficial, a estabilização de emulsões é também utilizada como um indicador da atividade superficial (Abu-Ruwaida et al, 1991). A capacidade emulsificante do biossurfatante obtido em manipueira F pelo isolado LB5a foi avaliada através do índice E_{24} com diferentes hidrocarbonetos (Tabela 9). Os índices obtidos (60-80%) revelam alta especificidade do surfatante contra todos os hidrocarbonetos testados, formando emulsões estáveis do tipo água /óleo (Figura 19).

Abu-Ruwaida et al. (1991) relataram que o surfatante produzido por *Rhodococcus* ST-5 apresentava menor atividade emulsificante frente a hidrocarbonetos de cadeia curta do que para hidrocarbonetos de cadeia longa. A capacidade emulsificante do surfatante

de *B. subtilis* LB5a não parece estar relacionada ao tamanho da cadeia hidrocarbonada. A habilidade em formar emulsões com óleo de soja e gordura de côco sugere potencial para aplicação como agente de limpeza e agente emulsificante na indústria de alimentos.

Tabela 9. Atividade emulsificante do biosurfatante de LB5a obtido em manipueira

Hidrocarboneto	E ₂₄ (%)
Hexano	66,6
Tolueno	72,7
Heptano	66,6
Decano	70,4
Querosene	70,4
Tetradecano	70,9
Hexadecano	69,0
Óleo de soja	74,0
Gordura e côco	70,9
Petróleo	69,0



Figura 19. Atividade emulsificante (E₂₄) de solução de biosurfatante LB5a frente a diferentes hidrocarbonetos. (1) Hexano, (2) Tolueno, (3) Heptano, (4) Decano, (5) querosene, (6) Tetradecano, (7) Hexadecano, (8) Óleo de soja, (9) Gordura de côco.

Com o objetivo de evidenciar o potencial do produto para biorremediação, realizou-se um teste simulando a contaminação de areia com petróleo. O experimento ilustrado nas Figuras 20 e 21 mostra que a areia tratada com solução de biosurfatante apresenta aspecto bem mais claro e as respectivas águas de lavagem ficaram mais escuras, demonstrando maior capacidade de remoção do petróleo em relação ao tratamento sem tensoativo.

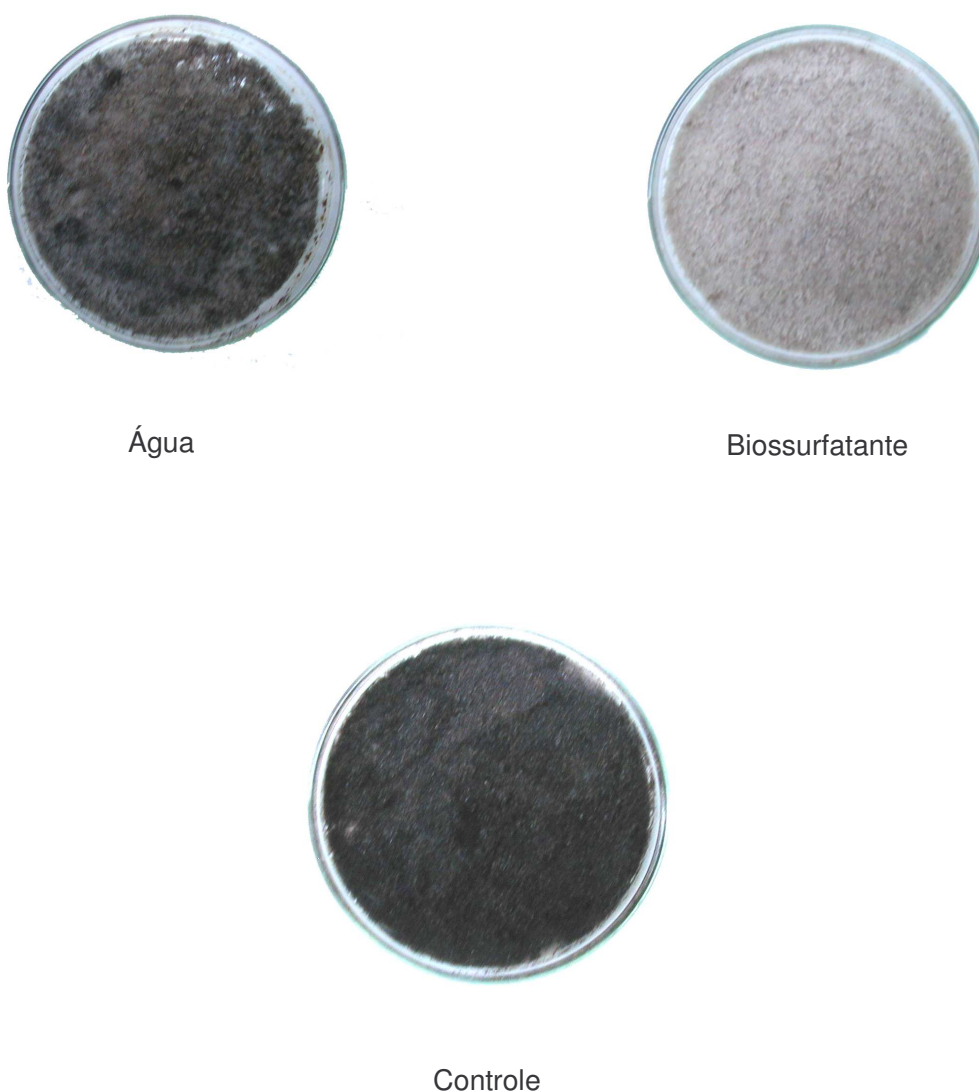


Figura 20. Capacidade de remoção de petróleo de amostra de areia utilizando solução de biossurfatante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira.

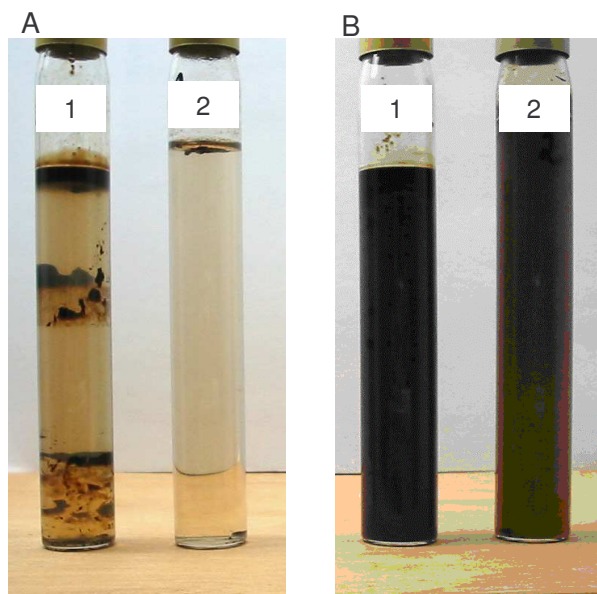


Figura 21. Águas de lavagem da areia impregnada com petróleo.
A - água B - solução aquosa (1mg/mL) de biossurfatante LB5a

Em ensaio similar utilizando areia saturada com querosene observou-se que o surfatante foi capaz de remover aproximadamente 60% do querosene presente na areia, em relação a um controle com água, onde somente 10% do querosene foi removido. Estes resultados demonstram que o surfatante produzido em manipueira pode ser explorado como agente para biorremediação de ambientes contaminados.

A atividade antibiótica da surfactina produzida por *B. subtilis* LB5a em meio de manipueira foi testada frente a bactérias e fungos. O espectro antimicrobiano do lipopeptídeo é demonstrado na Tabela 10. Todas as bactérias testadas, exceto o próprio *B. subtilis*, demonstraram susceptibilidade ao produto. *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 22) foi a bactéria gram-negativa mais sensível, enquanto que *E. coli*, *S. choleraesuis* e *S. marcescens* foram inibidas em menor grau. O lipopeptídeo também afetou o crescimento de bactérias gram-positivas principalmente *M. luteus* e *B. cereus*. O crescimento das leveduras e fungos testados não foi afetado pela presença do surfatante.

A atividade antimicrobiana observada neste estudo está de acordo com a descrita por outros autores (Yakimov et al.,1995) ou seja, a surfactina apresenta maior espectro de ação sobre bactérias quando comparado com a sua atividade sobre fungos e leveduras (Sandrin et al., 1990; Thimon et al.,1992). Estes resultados também confirmam a presença de um único tipo de lipopeptídeo na amostra, uma vez que iturina e fengicina de *B. subtilis* apresentam elevada ação antifúngica (Akpa et al., 2001). Considerando apenas os microrganismos testados e a metodologia empregada, não é possível afirmar que as bactérias gram-negativas são mais sensíveis que as gram-positivas, embora *P. aeruginosa* tenha demonstrado a maior sensibilidade ao produto.

Tabela 10. Atividade antimicrobiana do lipopeptídeo de *B. subtilis* LB5a.

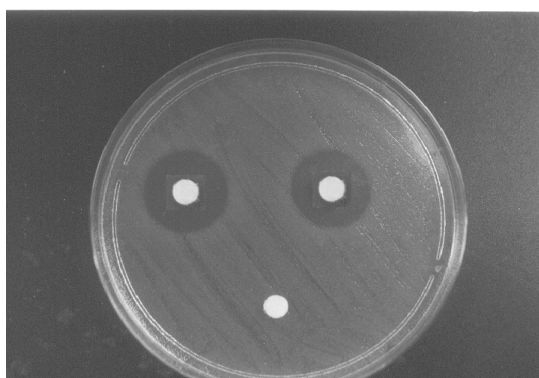
Microrganismos**	Sensibilidade *	
	100 µg	200 µg
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	++	++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	+	++
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698	++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	++++	++++
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 25729	+	++
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 1953	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	++
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 10708	+	++

*diâmetro dos halos:< 5 mm (-), 5-8 mm (+), 8-12 mm (++) ,12-18 mm (+++), >18 mm (++++).

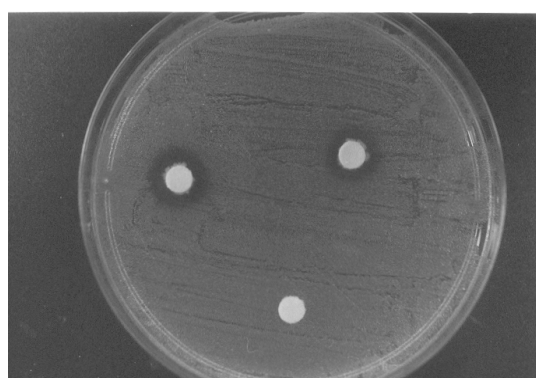
**Não houve inibição do crescimento de: *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor michei*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum sp*, *Alternaria macrospora*, *Rhizopus oligosporus*, *Fusarium oxysporium*, *Paecilomyces sp.*, *Neurospora sp.*

Bactérias pertencentes aos gêneros *Mycoplasma*, cujas células possuem membrana em tripla camada e ausência de parede celular (Vollenbroich et al., 1997b),

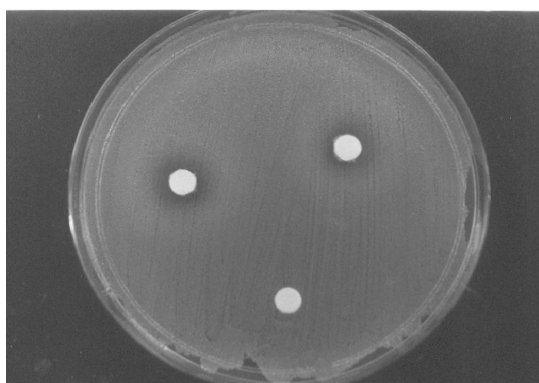
Mycobacterium, que possuem parede celular rica em ácidos graxos de cadeia longa (Arima et al.,1972) e alguns vírus com envelope (Vollenbroich et al.,1997a) são inibidos efetivamente pela presença de surfactina. Este fatos levaram à hipótese de que a ação antimicrobiana da surfactina e dos lipopeptídeos cíclicos em geral, estaria relacionada à interação da molécula com a membrana celular (Maget-Dana & Ptak, 1995).



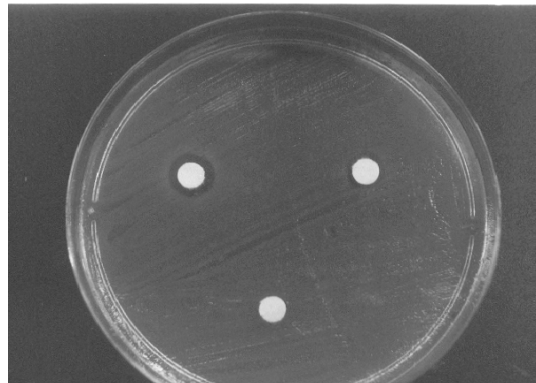
Pseudomonas aeruginosa



Micrococcus luteus



Staphylococcus aureus



Serratia marcescens

Figura 22. Teste de atividade antimicrobiana do surfatante obtido por *B. subtilis* LB5a.

De fato, foi demonstrado que as propriedades da membrana celular se modificam pela interação da surfactina com os fosfolipídeos, causando flutuações estruturais que estariam relacionadas com a atividade antibiótica dos lipopeptídeos. Embora o exato

mecanismo de ação dos lipopeptídeos ainda não tenha sido esclarecido, foi demonstrado que certos lipopeptídeos cíclicos atuam sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas através da formação de canais na membrana (Carillo et al.,2003). Este tipo de lipopeptídeos, como a surfactina, que agem rapidamente sobre a integridade da membrana e não sobre outros processos vitais da célula, podem constituir-se na próxima geração de antibióticos (Carillo et al.,2003).

As diferenças observadas na atividade do lipopeptídeo contra fungos, bactérias e leveduras pode ser explicada pela diversidade na composição de suas paredes celulares. Cabe ainda ressaltar que os ensaios realizados visaram a verificação do potencial antimicrobiano do surfatante, sendo utilizadas apenas algumas cepas de bactérias e fungos; portanto, sugere-se que maior número de microrganismos sejam testados e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) determinadas para caracterizar completamente as propriedades antimicrobianas deste lipopeptídeo. Particularmente interessante seria investigar a atividade antimicrobiana deste produto frente a diferentes linhagens de *Pseudomonas*, pois os relatos de literatura não citam esta bactéria como sendo sensível à ação da surfactina.

Os experimentos demonstraram que o biosurfatante (surfactina), produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira, foi capaz de inibir a infectividade dos vírus VSIV e MHV-3 em cultivos “*in vitro*”. Nas condições de ensaio testadas, a surfactina foi capaz de inibir a infectividade da amostra de VSIV, testando-se 100TCID₅₀ na concentração de 12,5µM. Para o MHV-3, a concentração inibidora da infectividade foi 5µM. Na Figura 23 são mostrados os efeitos característicos dos vírus sobre as linhagens celulares testadas.

Dados da literatura já haviam demonstrado resultados da inibição do VSIV onde concentrações de 80µM de surfactina reduziram o título em 10^{4,5} TCID₅₀/mL após 60 minutos e em 10^{5,4} TCID₅₀/mL após 120 minutos de incubação (Vollenbroich et al.,1997a).

Itokawa et al. (1994) relataram que a surfactina apresentou atividade antiviral contra HIV-1 na concentração efetiva 50% entre 14-20 μ M.

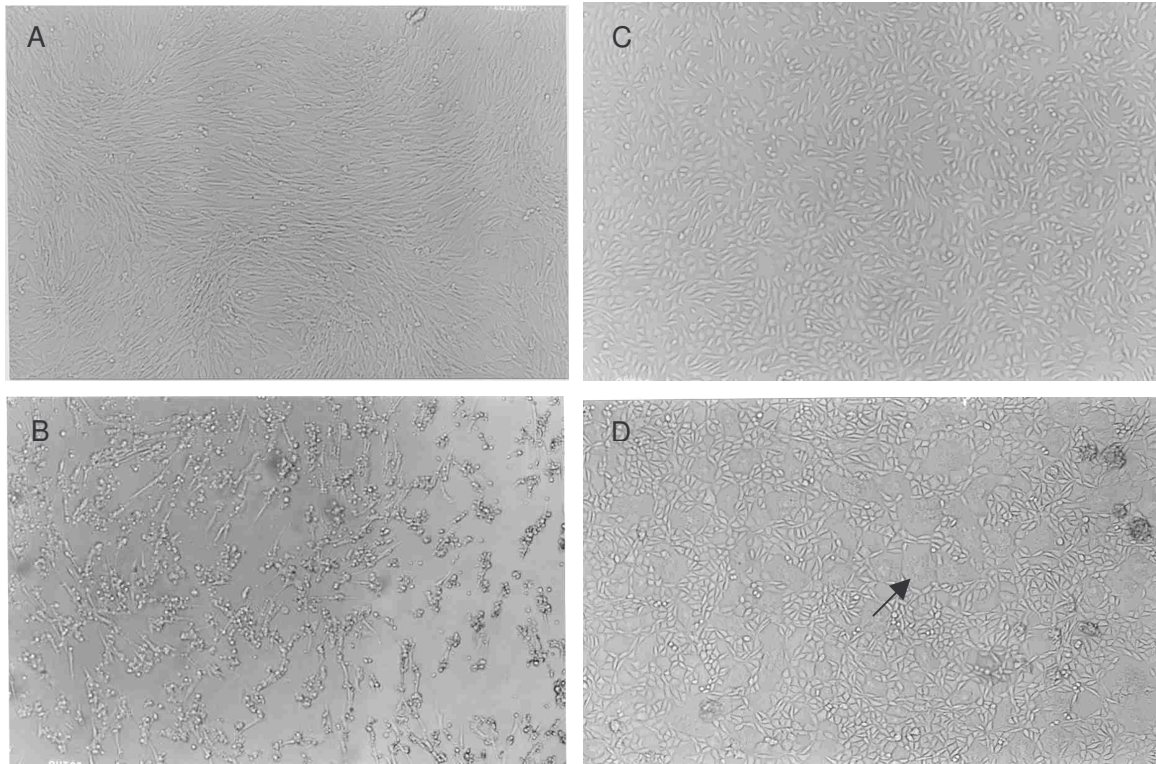


Figura 23. Efeito citopático dos vírus sobre as linhagens celulares. A- controle BHK-21 B- BHK com efeito de VSIV C- controle L929 D- L929 com efeito MHV-3 (aumento 100x). A seta indica um sincício.

Em relação ao mecanismo de ação, sabe-se que a surfactina age diretamente sobre o envelope lipídico do vírus, causando o rompimento e até sua completa destruição em altas concentrações. O envelope é formado por proteínas e glicoproteínas características que são codificadas pelo material genético viral, e por uma bicamada lipídica adquirida da membrana citoplasmática, nuclear ou de organelas da célula hospedeira (Brock et al., 1994). O dano ao envelope, e conseqüentemente, às proteínas e/ou glicoproteínas virais envolvidas na adsorção e penetração nas células, seria a causa principal da redução na infectividade viral (Vollenbroich et al., 1997a). Estes mesmos autores também

observaram que o vírus envelopado SFV (Semliki Forest vírus) da família *Togaviridae* não apresentou susceptibilidade à surfactina. Estes resultados sugerem que além da interação com a membrana (envelope) viral, a composição do envelope (proteínas, lipídeos, glicoproteínas) deve ter influência no efeito antiviral da surfactina.

Os valores de concentração capazes de inibir o efeito dos vírus sobre as células (12,5 μ M para VSIV e 5 μ M para MHV-3) foram inferiores à concentração mínima que induziu a 50% de efeito citotóxico (15 μ M para BHK-21 e 12,5 μ M para L929), sugerindo que o produto pode ser utilizado como agente antiviral “*in vitro*”, eliminando contaminantes virais em cultivos e linhagens celulares. Sabendo-se que as concentrações determinadas causaram 50% de efeito citotóxico, valores superiores de concentração de surfatante poderiam ser utilizadas uma vez que as células restantes, após retirada do surfatante, podem ser recuperadas ficando livres de contaminação viral.

Embora os dois tipos de vírus avaliados apresentem envelope, notou-se diferenças na sensibilidade ao surfatante, sendo que o MHV-3 se mostrou mais sensível que o VSIV. Esta observação reforça a idéia de que a ação da surfactina sobre os vírus está relacionada não somente com a presença do envelope mas também com a composição do mesmo. A diversidade de composição dos envelopes torna os vírus mais ou menos sensíveis a ação do surfatante, considerando-se o mecanismo de ação do mesmo.

Os resultados observados sugerem que novos estudos devem ser conduzidos para avaliar a atividade do surfatante sobre outros tipos de vírus, relacionando a ação antiviral com a composição química do envelope; bem como estudar o efeito do produto sobre a replicação e adesão de vírus não envelopados, como por exemplo o rotavírus, que passa por uma etapa intracelular de aquisição de membrana viral para a glicosilação de proteínas do capsídeo.

Em relação a atividade antiviral e antibacteriana da surfactina produzida em manipueira por *B. subtilis* LB5a; deve-se considerar o predomínio da molécula de *m/z*

1035 e a presença de dímeros no produto obtido, diferente do observado para o padrão de surfactina comercial. Recomenda-se que em trabalhos futuros seja investigada a separação das diferentes isoformas presentes e a verificação individual da respectiva atividade biológica.

6. PRINCIPAIS RESULTADOS

- O isolado *B. subtilis* LB5a foi selecionado por demonstrar a melhor capacidade de crescimento e produção de biossurfatante, em meio de manipueira, dentre todos os microrganismos testados.
- Entre as várias preparações testadas, a manipueira F (sem sólidos insolúveis) foi a mais adequada para a produção de biossurfatante por *B. subtilis* LB5a.
- O isolado *B. subtilis* LB5a produziu 3,0 g/L de surfatante bruto, reduziu a tensão superficial para valor mínimo de 26,6 mN/m e apresentou CMC⁻¹ de 90 em manipueira F.
- A cepa *B. subtilis* 21332 demonstrou queda acentuada na concentração de surfatante após 48 horas de cultivo em meio de manipueira.
- A degradação do surfatante observada em *B. subtilis* 21332 demonstrou relação com a atividade de protease presente no meio, sugerindo ação enzimática sobre a própria molécula do tensoativo produzido, bem como sobre o surfatante de *B. subtilis* LB5a.
- O tensoativo produzido por *B. subtilis* LB5a demonstrou estabilidade térmica, estabilidade em pH acima de 5,0 e tolerância a concentrações de NaCl em até 20%.
- A análise bioquímica do biossurfatante revelou a presença de 53,6% de lipídeos e 38,5% de proteínas, caracterizando-o como um lipopeptídeo.

- A análise de aminoácidos indicou a presença de ácido glutâmico, ácido aspártico, valina e leucina na proporção 1:1:1,2:3,4.
- A tensão interfacial contra hexadecano foi de 0,96mN/m e a CMC estimada foi de 33mg/L.
- A análise estrutural demonstrou que o tensoativo produzido em manipueira por *B. subtilis* LB5a é um lipopeptídeo, cuja espécie molecular predominante possui *m/z* de 1036, e sete aminoácidos na seqüência RO-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu na porção peptídica, permitindo identificar o surfatante como sendo surfactina.
- O surfatante foi capaz de formar emulsões estáveis com hexano, tolueno, heptano, decano, querosene, tetradecano, hexadecano, petróleo, óleo de soja e gordura de côco, demonstrando potencial para biorremediação e emulsificação de óleos e gorduras.
- A atividade biológica do biossurfatante foi demonstrada em concentrações de 100-200 µg/µL contra bactérias, especialmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Micrococcus luteus*. Entretanto, não foi observada atividade inibitória contra os fungos e leveduras testados.
- Os vírus envelopados testados, VSIV e MHV, foram inibidos por concentrações de 12,5 µM e 5 µM de surfatante, sendo que o efeito citotóxico ficou evidenciado para linhagens celulares L929 e BHK-21 em concentrações acima de 12,5 µM e 15µM respectivamente.

7. CONCLUSÃO

A manipueira demonstrou potencialidade como meio de cultura alternativo para produção de biossurfactantes, sendo que o isolado selecionado *Bacillus subtilis* LB5a foi capaz de produzir o lipopeptídeo surfactina quando cultivado em meio de manipueira livre de sólidos. O surfatante obtido demonstrou capacidade para biorremediação e emulsificação de óleos e gorduras, bem como atividade antibacteriana e antiviral.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando-se os resultados aqui apresentados sugere-se:

- aprofundar os estudos de atividade antimicrobiana e antiviral do biossurfactante;
- separar e caracterizar as diferentes isoformas presentes no biossurfatnte, quanto as suas propriedades e ação biológica;
- caracterizar o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LB5a em manipueira integral;
- separar, purificar e caracterizar a protease produzida por *B. subtilis* 21332 em manipueira F;
- comparar as propriedades do surfatante produzido por *B. subtilis* 21332 em manipueira F com as definidas para *B. subtilis* LB5a;
- comparar os resultados de atividade biológica do surfatante obtido com a surfactina padrão.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AKPA,E.; JACQUES,P.; WATHELET, B.; PAQUOT, M.; FUCHS, R.; BUDZIKIEWICZ, H.; THONART, P. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93 : 551-561, 2001.

ANWAR, A.; SALEEMUDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, 64: 175-183, 1998.

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

ARIMA, K. ; KAKINUMA, A .; TAMURA, G. **Surfactin**. US patent 3.687.926, 29 ago. 1972.

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

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

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

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

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

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

BANAT,I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, 198: 44-47, 2000.

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

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

BESSION,F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*. Evidence for amino acid activating enzymes. **Biotechnology Letters**, 14: 1013-1018, 1992.

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

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

BROCK,T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Viruses**. In: Biology of Microorganisms. BROCK,T.D.; MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. eds., Prentice-Hall, New Jersey, p.183-236, 1994.

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

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

CARRILO, C.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F.J.; ORTIZ, A . Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1611: 91-97, 2003.

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

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, 48: 747-750, 1984.

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

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

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

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

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

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

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

DEL BIANCHI, V.L.; CEREDA, M.P. Balanço de massa de uma fábrica de farinha de mandioca de médio porte do Estado de São Paulo. **Energia na Agricultura**, 14 (3): 34-48, 1999.

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

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

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

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical Science Research**, 26: 181-185, 1998.

FLEURI, L.F. **Produção de β 1,3 - glucanases, proteases líticas, quitinases por microrganismos e aplicação na lise de leveduras**. Campinas, 2003. 141p. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

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

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

GOLDMAN, S.; SHABTAI, Y., RUBINOVITZ, C.; ROSENBERG, E.; GUTNICK, D.L. Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Applied and Environmental Microbiology**, 44: 165-170, 1982.

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

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

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

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

HBID,C.; JACQUES, P.; RAZAFINDRALAMBO, H.; MPOYO, M.K.; MEURICE, E.; PAQUOT, M.; THONART, P. Influence of the production of two lipopeptides, iturin A and surfactin S1, on oxygen transfer during *Bacillus subtilis* fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 57/58: 571-579, 1996.

HOMMEL,R. ; STUWER, O. ; STUBER, W. ; HAFERBURG, D. ; KLEBER, H.P. Production of water soluble surface-active exolipids by *Torulopsis bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 26: 199-205, 1987.

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

ITOKAWA, H.; MIYASHITA, T.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; HIRANO,T.; HOMMA, M.;OKA, K. Structural and conformational studies of Ile(7) and Leu (7) surfactins from *Bacillus subtilis natto*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 42: 604-607, 1994.

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

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

KAMEDA, Y.; OUHIRA, S.; MATSUI, K.; KANATOMO, S.; HASE, T.; ATSUSAKA, T. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 22: 938-944, 1974.

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

KAPPELI, O.; FINNERTY, W.R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, 140: 707-712, 1979.

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

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

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

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

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C.; STECHEY, D.; WOOD, J. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 61: 1735-1743, 1984.

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

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

LIN, S.C.; CARSWELL, M.M.; GEORGIU, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 41: 281-285, 1994.

- LIN, S.C.; JIANG, H.J. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. **Biotechnology Techniques**, 11(6): 413-416, 1997.
- MAGET-DANA, R.; PTAK, M. Interactions of surfactin with membrane models. **Biophysical Journal**, 68:1937-1943, 1995.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 74 (7): 887-889, 1997.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2(3): 367-372, 1999a.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources – a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2: 237-241, 1999b.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58: 428-434, 2002.
- MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M.J.; ANDRES, C. DE.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, 43: 1-6, 1993.
- MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 71 (1): 61-64, 1994.
- MILES, A. A.; MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of blood. **Journal of Hygiene**, 38: 732-749, 1938.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 31: 426-428, 1959.
- MILLER, R.M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal contaminated soils. **Environmental and Health Perspectives**, 103: 59-62, 1995.
- MOSES, V. Microbes and oil recovery. **Microbiological Sciences**, 4: 305-333, 1987.
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. **Factors influencing the economics of biosurfactants**. In: Biosurfactants: production, properties, applications. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 392-371, 1993.
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 47: 23-29, 1990.
- MULLIGAN, C.N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, 12: 199-210, 1989.

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

NARUSE, N.; TENMYO, O .; KOBARU, S.; KAMAI, H.; MIYAKI, T.; KONISHI, M.; OKI, T. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. **Journal of Antibiotics**, 43: 267-280, 1990.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, 14(2): 1165-1168, 1992.

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

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

PATEL, M.N.; GOPINATHAN, K.P. Lysozyme sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, 52: 1224-1226, 1986.

PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Control biosynthesis of Val-7 and leu-7 surfactins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 36: 515-517, 1992.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; LABBE, H.; GRANGEMARD, I.; DAS, B.C.; PTAK, M; WALLACH, J.; MICHEL, G. [Ala4] surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. **European Journal of Biochemistry**, 224: 89-96, 1994.

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

POLMAN, J.K.; MILLER, K.S.; STONER, D.L.; BRACKENRIDG, C.R. Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthesized surfactants. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** , 61:11-17, 1994.

RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; DELEU, M.; HBID,C.; JACQUES, P. ;THORNAT, P. ; PAQUOT, M. Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*; effect of lipid and peptide structural attributes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46: 911-916, 1998.

RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; DESTAIN, J.; THORNAT, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 639: 81-85, 1993.

REED, L.J.;MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, 27:493-497, 1938.

REISER, J.; KOCH, A. K., OCHSNER, U. A.; FIECHTER, A. **Genetics of surface active compounds**. In: Biosurfactants: production, properties, applications. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 231-249, 1993.

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

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

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; GOTTLIEB, A.; ROSENHAK, S.; RON, Z.E. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. **Applied and Environmental Microbiology**, 54: 317-322, 1988.

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

RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D.L.; ROSENBERG, E. Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of chloramphenicol. **Journal of Bacteriology**, 152: 126-132, 1982.

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

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

SEN, R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 68:263-270, 1997.

SHEPHORD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, 40: 207-217, 1995.

SHEPPARD, J.D.; COOPER, D.G. The effect of biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 48: 325-336, 1990.

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

STACHELHAUS, T.; SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M.A. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. **Science**, 269: 5571-5574, 1995.

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

- THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MICHEL, M.G. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microbiological Letters**, 128:101-106, 1995.
- THIMON, L.; PEYPOUX, F.; DAS, B.C.; WALLACH, J.; MICHEL, M.G. Seletive esterification of surfactin: preparation and properties of surfactin methylesters. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 20: 415-423, 1994.
- THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MAGET-DANA, R.; MICHEL, M.G. Surface-active properties of antifungal lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 69 (1): 92-93, 1992.
- THOMPSON, D.N.; FOX, S.L.; BALA, G.A. Biosurfactants from potato process effluents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 84/86 : 917-929, 2000.
- UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mono and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agricultural and Biological Chemistry**, 53: 757-763, 1989.
- VELRAEDS-MARTINE, M.C.; VANDER MEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J. Physiochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biological interfaces**, 8:51-61, 1996.
- VAN DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, 9: 241-252, 1991.
- VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid Polymer Sciences**, 72: 12-18, 1986.
- VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, 25: 289-297, 1997a.
- VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(1): 44-49, 1997b.
- WEI, Y.H. ; CHU, I.M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 724-728, 1998.
- YAKIMOV, M.M.; TIMMIS, K.N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H.L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus liqueniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(5): 1706-1713, 1995.