



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES
VISANDO A APLICAÇÃO INDUSTRIAL E EM PROCESSOS DE
BIORREMEDIAÇÃO**

Ani Beatriz Jackisch Matsuura, MSc.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

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

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Matsuura, Ani Beatriz Jackisch

M429p Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação / Ani Beatriz Jackisch Matsuura. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Lucia Regina Durrant

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Biossurfactantes. 2. Microrganismos. 3. Biorremediação. 4. *Planococcus citreus*. I.Durrant, Lucia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

ckn

Banca Examinadora

Dra. Lucia Regina Durrant (Orientadora)

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte (Titular)

Dr. Alexandre Nunes Ponezzi (Titular)

Dr. Ranulfo Monte Alegre (Titular)

Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti (Titular)

Dr. José Luiz Pereira (Suplente)

Dr. Fumio Yokoya (Suplente)

*O segredo de progredir é começar.
O segredo de começar é dividir as
tarefas árduas e complicadas em
tarefas pequenas e fáceis de
executar, e depois começar pela
primeira.*

(Mark Twain)

AGRADEÇO a Deus, por ter permitido completar mais essa etapa da vida....

DEDICO aos meus pais Ilgo e Miria Jackisch pelo carinho e apoio...

OFEREÇO ao meu marido
*Takeshi Matsuura pelo amor,
paciência e companheirismo...*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade da realização do curso de Doutorado em Ciência de Alimentos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da Bolsa;

À Profa. Dra. Lucia Regina Durrant pela orientação e amizade durante a realização deste trabalho;

Aos membros da Banca Examinadora pelas valiosas sugestões e correções;

À Coordenação e Secretaria da Pós-graduação, pelo apoio prestado durante o desenvolvimento do curso;

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin e Leonardo Silva Santos do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas pela colaboração para a caracterização química do composto;

À Ana Claudia, técnica do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana e amiga, pelos inúmeros auxílios prestados;

À Maria Francisca Simas Teixeira pelos incentivos;

Aos meus valiosos amigos conhecidos nesta etapa, em especial à Luciana e Márcia pelos bons momentos convividos;

Á todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Biossurfactantes: Definição e Função.....	4
3.2. Tipos de biossurfactantes.....	5
3.3. Aplicação dos biossurfactantes.....	8
3.4. Produção dos biossurfactantes.....	12
3.5. Isolamento e caracterização de biossurfactantes.....	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Seleção das linhagens fúngicas da Região Amazônica.....	16
4.2. Seleção da linhagem mais eficiente na produção de biossurfactante.....	18
4.3. Produção de biossurfactante por <i>Planococcus citreus</i>	20

4.4. Comparação dos biossurfactantes isolados com surfactantes químicos comerciais e surfactina.....	22
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos biossurfactantes isolados.....	24
4.6. Caracterização química dos biossurfactantes.....	25
4.7. Avaliação do tempo de estocagem do biossurfactante.....	26
4.8. Avaliação de diferentes meios de cultura e substrato para a produção de biossurfactante.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Seleção das linhagens fúngicas da Região Amazônica.....	30
5.2. Seleção da linhagem mais eficiente na produção de biossurfactante.....	35
5.3. Produção de biossurfactante por <i>Planococcus citreus</i>	37
5.4. Comparação dos biossurfactantes isolados com surfactantes químicos comerciais e surfactina.....	43
5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana dos biossurfactantes isolados.....	49
5.6. Caracterização química dos biossurfactantes.....	50
5.7. Avaliação do tempo de estocagem do biossurfactante.....	56
5.8. Avaliação de diferentes meios de cultura e substrato para produção de biossurfactante	57
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
8. APÊNDICES.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.....	6
Tabela 4.1. Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante.....	18
Tabela 4.2. Período de incubação até a 1 ^a e 2 ^a coleta para a avaliação de produção de biossurfactantes.....	19
Tabela 4.3. Tabela com os microrganismos-teste com seus meios específicos, temperatura e período de incubação.....	24
Tabela 5.1. Atividade de emulsificação das 11 linhagens de leveduras provenientes da Região Amazônica, obtidos de borra oleosa.....	30
Tabela 5.2. Atividade de emulsificação das 26 linhagens de fungos filamentosos provenientes da Região Amazônica, obtidos de borra oleosa e solo.....	32
Tabela 5.3. Medida de tensão superficial e atividade de emulsificação dos 14 microrganismos testados quanto à produção de biossurfactante em óleo diesel 10%.....	36
Tabela 5.4. Avaliação da tensão superficial da água a 20 °C com diferentes concentrações de biossurfactante liofilizado B9.....	44
Tabela 5.5. Avaliação da tensão superficial da água a 20 °C com diferentes surfactantes químicos e o biossurfactante surfactina.....	44
Tabela 5.6. Atividade emulsificante dos surfactantes comerciais e do biossurfactante B9 em diferentes concentrações.....	45
Tabela 5.7. Avaliação do extrato bruto durante 12 meses, quanto à redução da tensão superficial e atividade emulsificante.....	56
Tabela 8.1. Tensão superficial apresentado pelo ensaio com Meio Cooper com 1% de glicose (A), com 0,1% de glicose (B) e 0% de glicose (C) e 10% de óleo diesel, em triplicata, a sua média e desvio padrão.....	78
Tabela 8.2. Atividade emulsificante do tipo O/A (absorbância a 610 nm) apresentado pelo ensaio com Meio Cooper com 1% de glicose (A), com 0,1% de glicose (B) e 0% de glicose (C) e 10% de óleo diesel, em triplicata, a sua média e desvio padrão.....	79

Tabela 8.3. Tensão superficial apresentado pelo ensaio com Meio Cooper com 0,1% de glicose com 1% de óleo de fritura (A), 10% de óleo de fritura (B) e 10% de óleo diesel (C), em triplicata, a sua média e desvio padrão.....	80
Tabela 8.4. Atividade emulsificante do tipo O/A (absorbância a 610 nm) pelo ensaio com Meio Cooper com 0,1% de glicose com 1% de óleo de fritura (A), 10% de óleo de fritura (B) e 10% de óleo diesel (C), em triplicata, a sua média e desvio padrão.....	81
Tabela 8.5. Tensão superficial apresentado pelo ensaio com Meio Robert (A) e Meio Kim (B) com 1% de óleo de fritura, em triplicata, a sua média e desvio padrão.....	82
Tabela 8.6. Atividade emulsificante do tipo O/A (absorbância a 610 nm) apresentados pelos ensaios com Meio Robert (A) e Meio Kim (B) com 1% de óleo de fritura, em triplicata, a sua média e desvio padrão.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolípídeo (A e B) e lipopeptídeo(C).....	5
Figura 4.1. <i>Planococcus citreus</i> crescido no meio GYP durante 72h.....	20
Figura 5.1. Bactéria <i>Planococcus citreus</i> crescida em meio de cultura com 10% de óleo diesel, pH 7, por 60 horas, com emulsificação de todo o óleo.....	38
Figura 5.2. Curva de redução da tensão superficial do meio para <i>P. citreus</i> crescido durante 96h em diferentes valores de pH.....	38
Figura 5.3. Atividade emulsificante do tipo O/A apresentado por <i>P. citreus</i> , crescido durante 96h em diferentes valores de pH.....	39
Figura 5.4. Emulsão O/A obtida com o sobrenadante do meio com <i>P. citreus</i> após 72 h – A: controle; B: amostra.....	40
Figura 5.5. Extrato bruto de biossurfactantes produzidos por <i>P. citreus</i> : A- extração com clorofórmio-metanol; B – precipitação com sulfato de amônio.....	42
Figura 5.6. Emulsão A/O apresentado pelo biossurfactante B9S (200 mg/L) isolado por precipitação com sulfato de amônio após 3 dias – A: controle; B: amostra.....	46
Figura 5.7. Efeito fitotóxico, em sementes de <i>Latuca sativa</i> , dos surfactantes comerciais e dos biossurfactantes B9 e B9S em diferentes concentrações.....	47
Figura 5.8. Determinação de CMC - tensão superficial versus concentração do extrato bruto do biossurfactante liofilizado.....	48
Figura 5.9. Espectro de Massas do biossurfactante B9 com Rf 0,6 produzido por <i>P. citreus</i>	51
Figura 5.10. Espectro de Infravermelho da banda com Rf 0,6 do biossurfactante B9 produzido por <i>P. citreus</i>	51
Figura 5.11. Espectro de Infravermelho do biossurfactante (lipopeptídeo) de <i>Bacillus licheniformes</i> JF-2 (JENNY et al., 1991).....	52
Figura 5.12. Espectro de Infravermelho de sofrorolípídeo (glicolípídeo) antes e depois da purificação (HU e JU, 2001).....	52

Figura 5.13. Espectro de ^1H -RMN do biossurfactante B9 com Rf 0,6. O solvente usado foi CDCl_3 , 300 MHz.....	53
Figura 5.14. Espectro de massa do biossurfactante B9S com Rf 0,52 produzido por <i>P. citreus</i>	54
Figura 5.15. Espectro de ^1H -RMN do biossurfactante B9S com Rf 0,52. O solvente usado foi CDCl_3 , 300 MHz.....	55
Figura 5.16. Redução da tensão superficial obtida durante 96h em Meio Cooper com diferentes concentrações de glicose e com 10% de óleo diesel.....	59
Figura 5.17. Atividade emulsificante do tipo O/A obtida durante 96h em Meio Cooper com diferentes concentrações de glicose e com 10% de óleo diesel.....	59
Figura 5.18. <i>P. citreus</i> crescido por 48 h em meio Cooper (0,1% de glicose) utilizando 1% de óleo residual de fritura (A), 10% de óleo residual de fritura (B) e 1% de óleo diesel (C).....	60
Figura 5.19. Avaliação do meio Cooper com 0,1% de glicose, usando como substrato oleoso 1 e 10% de óleo residual de fritura e 1% de óleo diesel.....	61
Figura 5.20. Atividade emulsificante do tipo O/A no meio Cooper com 0,1% de glicose, usando como substrato oleoso 1 e 10% de óleo residual de fritura e 1% de óleo diesel.....	61
Figura 5.21. Redução da tensão superficial obtido com <i>P. citreus</i> crescido durante 120h em Meio Robert e Meio Kim com 1% de óleo residual de fritura.....	62
Figura 5.22. Atividade emulsificante obtida com <i>P. citreus</i> crescido durante 120h em Meio Robert e Meio Kim com 1% de óleo residual de fritura.....	63

RESUMO

Foi realizado um estudo para a seleção do melhor produtor de biossurfactante entre 48 microrganismos dos quais 5 bactérias, 11 leveduras, 27 fungos filamentosos (deuteromycetes) e 5 basidiomycetes, provenientes da Região Amazônica e da Coleção de Cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/FEA/UNICAMP. Esses microrganismos foram cultivados em meio líquido com 10% de óleo diesel. Entre os microrganismos testados foi selecionada a bactéria *Planococcus citreus*, cujo biossurfactante foi isolado e caracterizado. Dependendo do método de isolamento empregado, extração com clorofórmio:metanol ou precipitação com sulfato de amônio, foi obtido um biossurfactante com boa atividade emulsificante do tipo óleo em água (B9) ou do tipo água em óleo (B9S), respectivamente. O biossurfactante B9 foi obtido na concentração de 0,28 g/L e o B9S na concentração 0,11 g/L. Quando os biossurfactantes foram produzidos em fermentador durante 72 h a concentração do biossurfactante B9 foi 0,53 g/L e para o B9S 0,031 g/L. O biossurfactante B9 reduziu a tensão superficial da água para 37 mN/m (5 g/L), mas nessa condição apresentou efeito fitotóxico. O B9S apresentou excelente atividade emulsificante em baixa concentração (0,2 g/L) e sem fitotoxicidade. Essas frações foram caracterizadas por Espectrometria de Massas, Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear. Em cada uma dessas frações foram encontradas uma mistura de 10 oligômeros, com variação de massa de 502 a 899. A atividade antimicrobiana desses biossurfactantes foi avaliada, mas não apresentaram qualquer atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, levedura ou fungo filamentoso. Com o emprego de óleo residual de fritura como substrato hidrofóbico alternativo, obteve-se produção de biossurfactante por *Planococcus citreus*, mas com um aumento no período de produção (96h). O biossurfactante B9 apresentou as mesmas características de redução de tensão superficial, atividade emulsificante e fitotoxicidade durante um período de estocagem de 12 meses.

SUMMARY

Screening for the best biosurfactant-producing microorganism was carried out using 48 microorganisms, 5 bacteria, 11 yeasts, 27 filamentous fungi (deuteromycetes) and 5 basidiomycetes, from the Amazon Area and from the Culture Collection of the Systematic and Microbial Physiology Laboratory/FEA/UNICAMP. The microorganisms were cultivated in media with diesel oil 10% (v/v). *Planococcus citreus* was selected from the 48 microorganisms. Biosurfactant was isolated from the culture broth and lyophilized. Depending on the isolation method, extraction with chloroform and methanol or precipitation with ammonium sulfate, a biosurfactant presenting good oil in water (B9) or water in oil (B9S) emulsification, respectively, was obtained. Biosurfactant B9 was obtained at the concentration 0.28 g/L and B9S at 0.11 g/L. When the biosurfactants were produced in a fermenter for 72 h the concentration of the biosurfactant B9 was 0.53 g/L and of B9S 0.031 g/L. Biosurfactant B9 reduced the water surface tension to 37 mN/m (5 g/L), but in this condition it also presented a phytotoxic effect. B9S presented excellent emulsification activity at low concentration (0.2 g/L) and without showing a phytotoxic effect. These two fractions were characterized by ESI (+)-MS using a mass spectrometer, FT-IR and Nuclear Magnetic Resonance. In each one of these fractions a mixture of 10 oligomers, with a variation in masses from 502 to 899 was found. No antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeast and filamentous fungi, was produced by either of these fractions. *P. citreus* showed satisfactory growth and the production of surface-active compounds when cultivated in industrial frying-oil wastes, but with an increase in the required production time (96h). Biosurfactant B9 presented the same characteristics of reduction in superficial tension, emulsification activity and phytotoxicity over a twelve-month storage period.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos biológicos anfifílicos, contendo uma porção polar e outra apolar, o que lhes confere a habilidade de agir nas superfícies e interfaces.

A produção de biossurfactantes pelas bactérias, leveduras e fungos filamentosos está associada geralmente à utilização de substratos insolúveis em água. Para que estes fiquem disponíveis à célula microbiana, o microrganismo produz o biossurfactante que irá emulsificar o substrato (KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1987).

Os campos de aplicação dos biossurfactantes são diversos, devido a sua capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e formação de microemulsão, onde hidrocarbonetos podem ser solubilizados em água ou onde água pode ser solubilizada em hidrocarbonetos, conferindo a estes excelentes qualidades detergente e dispersante (DESAI; BANAT, 1997).

Surfactantes constituem uma classe importante de compostos amplamente usados em todos os setores da indústria moderna. Durante a década de 90 a demanda dos surfactantes aumentou em torno de 300% na indústria química dos Estados Unidos. No ano 2000, a produção mundial foi de aproximadamente 19 milhões de toneladas. Do total de surfactantes produzidos, 50% foram utilizados na fabricação de detergentes de uso doméstico e o restante destinado ao uso industrial, para produção de produtos de uso pessoal, indústria têxtil, indústria de óleo, etc. A maioria dos surfactantes ainda é derivada do petróleo, mas avanços rápidos na biotecnologia e o aumento da preocupação dos consumidores com a utilização de produtos que não agredem o meio ambiente têm aumentado a possibilidade do uso de surfactantes biológicos (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; DELEU; PAQUOT, 2004).

Quando os biossurfactantes foram descobertos, atraíram as atenções como surfactantes alternativos devido sua biodegradabilidade e segurança.

Surfactantes derivados de microrganismos possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos como a baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis e estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (FIECHTER, 1992; PRUTHI; CAMEOTRA, 1997; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Durante a última década, os biossurfactantes devido as suas propriedades biológicas, têm chamado a atenção em vários campos como material multifuncional para o novo século (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002).

Até o presente, no entanto, o uso industrial de biossurfactantes não é competitivo com os surfactantes sintéticos devido o alto custo de produção. A otimização, tanto da produção quanto da recuperação dos biossurfactantes no processo de fermentação, se faz necessário e isso será alcançado quanto maior for o conhecimento sobre o biossurfactante produzido.

2. OBJETIVOS

- Selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes entre linhagens fúngicas provenientes da Região Amazônica;
- Selecionar o microrganismo mais eficiente na produção de biossurfactantes entre as linhagens provenientes da Região Amazônica e da Coleção de Culturas do LSFM;
- Produzir o biossurfactante em escala laboratorial e determinar melhores condições de crescimento do microrganismo selecionado;
- Purificar e caracterizar o biossurfactante produzido pela cultura microbiana selecionada, para um melhor conhecimento a respeito do tipo de composto de superfície ativa obtido.
- Determinar a taxa de redução da tensão superficial, atividade de emulsificação e atividade antibiótica do biossurfactante isolado e compará-las as de surfactantes sintéticos e biossurfactantes disponíveis comercialmente.
- Avaliar a toxicidade do biossurfactante produzido pela linhagem selecionada, em relação a surfactantes sintéticos e biossurfactantes disponíveis comercialmente, através de teste de toxicidade;
- Determinar o tempo de estocagem para o biossurfactante obtido, em termos de declínio da atividade emulsificante e da redução da tensão superficial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BIOSSURFACTANTES: DEFINIÇÃO E FUNÇÃO

Os biossurfactantes foram descobertos na década de 60 como compostos extracelulares anfífilos em pesquisas de fermentações de hidrocarbonetos. Apresentam uma variedade de propriedades físicas e químicas, mas compartilham certos atributos. Todos apresentam pelo menos uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Devido a essa natureza anfífilica, os surfactantes se acumulam na interface (ar-água e óleo-água) e superfície. Como resultado, os surfactantes reduzem as forças de repulsão entre fases diferentes na interface ou superfície e permitem que as duas fases se misturem mais facilmente. Dessa forma, os biossurfactantes são definidos como compostos microbianos que exibem alta atividade surfactante e atividade emulsificante (COOPER; ZAJIC, 1980; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MAIER, 2003).

Para verificar a produção de biossurfactante numa cultura microbiana é necessário haver um método para determinar a atividade surfactante. O método mais empregado é a medição da tensão superficial do sobrenadante. Outras medidas indicam atividade surfactante. Entre estas, a redução da tensão interfacial entre uma fase aquosa e uma fase orgânica imiscível, estabilização de uma emulsão com óleo e água e formação de espuma (COOPER; ZAJIC, 1980). Um dos índices mais utilizados para avaliar a eficiência de um surfactante é a concentração crítica micelar (CMC). A CMC é a concentração mínima de surfactante requerida para alcançar os valores mais baixos de tensão interfacial ou de tensão superficial (LIN, 1996). A partir dessa concentração os surfactantes se associam em estruturas como micelas, vesículas ou lamelas e não ocorrerá maior redução na tensão superficial ou interfacial (MAIER, 2003).

Os biossurfactantes são sintetizados por uma variedade de microrganismos, principalmente por bactérias e arqueas, apresentando diferentes

estruturas químicas e propriedades surfactantes, fazendo com que apresentem diferentes funções naturais com diferentes aplicações. Essas diferenças fazem com que um grupo de surfactantes tenha vantagem em uma aplicação específica e outros sejam mais apropriados em outras aplicações. Isto torna também mais difícil generalizar sobre a função natural dos biossurfactantes, mas há ao menos três hipóteses: aumentar a área superficial de substratos hidrofóbicos; aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos e regular a fixação e a liberação do microrganismo de superfícies (ROSENBERG; RON, 1999; MAIER, 2003).

Considerando alguns biossurfactantes mais conhecidos de forma mais específica, a função da surfactina, por exemplo, está citada como relacionada com a formação do corpo de frutificação de *Bacillus subtilis* (BRANDA et al., 2001); o ramnolípido de *Pseudomonas aeruginosa* com a formação de biofilme (DAVEY; CAIAZZA; TOOLE, 2003) e a streptofactina com a formação de micélio aéreo em *Streptomyces tendae* (RICHTER et al, 1998).

3.2. TIPOS DE BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são classificados com base no seu maior grupo funcional ou de acordo com o microrganismo produtor (Tabela 3.1). Os maiores grupos incluem: glicolípídeos (Figura 3.1, A e B), lipoproteínas (Figura 3.1, C), fosfolípídeos, lipídeos neutros e ácidos graxos e biossurfactantes poliméricos.

Alguns autores preferem agrupar os biossurfactantes de acordo com seu peso molecular (RON; ROSENBERG, 2002; BACH et al., 2003). Os biossurfactantes de peso molecular baixo reduzem a tensão superficial de forma eficiente, já os polímeros de alto peso se ligam fortemente às superfícies, estabilizando emulsões óleo-água e água-óleo (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

Tabela 3.1. Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.

MICROORGANISMO	TIPO DE BIOSURFACTANTE
<i>Candida lipolytica</i>	“Liposan”
<i>Candida petrophilum</i>	Peptidolípídeo
<i>Candida tropicalis</i>	Complexo ácido graxo-polissacarídeo
<i>Torulopsis bombicola (Candida)</i>	Soforolípídeo
<i>Torulopsis petrophilum</i>	Glicolípídeo e/ou proteína
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipoproteína (surfactin)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Lipoheteropolissarídeo (Emulsan)
<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N	Ácidos graxos, mono e diglicerídios
<i>Arthrobacter</i>	Glicolípídeo
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Glicolípídeos sacarose e frutose
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipoproteína (lichenysin)
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Complexo proteína-polissacarídeo
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos corinomicólicos
<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC	Lípídeo neutro
<i>Nocardia erythropolis</i>	Lípídeos neutros
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolípídeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeo
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealose dimicolatos
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Fosfolípídeo
<i>Aspergillus sp.</i>	Fosfolípídeo
<i>Streptomyces tendae</i>	Streptofactina
<i>Flavobacterium sp.</i>	Flavolípídeos

Os biossurfactantes de baixo peso molecular são geralmente glicolípídeos. Um dos mais bem estudados glicolípídeos é o ramnolípídeo, produzido por várias espécies de *Pseudomonas*. Surfactantes de alto peso molecular atuam como dispersantes prevenindo a coalescência das gotas de óleos na água, são produzidos por um grande número de espécies de bactérias de diferentes gêneros e são compostos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos de misturas desses biopolímeros (RON; ROSENBERG, 2002). As bactérias produzem principalmente surfactantes tipo ramnolípídeos, trealolípídeos e lipopeptídeos, enquanto que leveduras produzem soforolípídeos e manosileritritolípídeos. Já os fungos filamentosos produzem ácido ustilágico e manosileritritolípídeos (BOGNOLO, 1999).

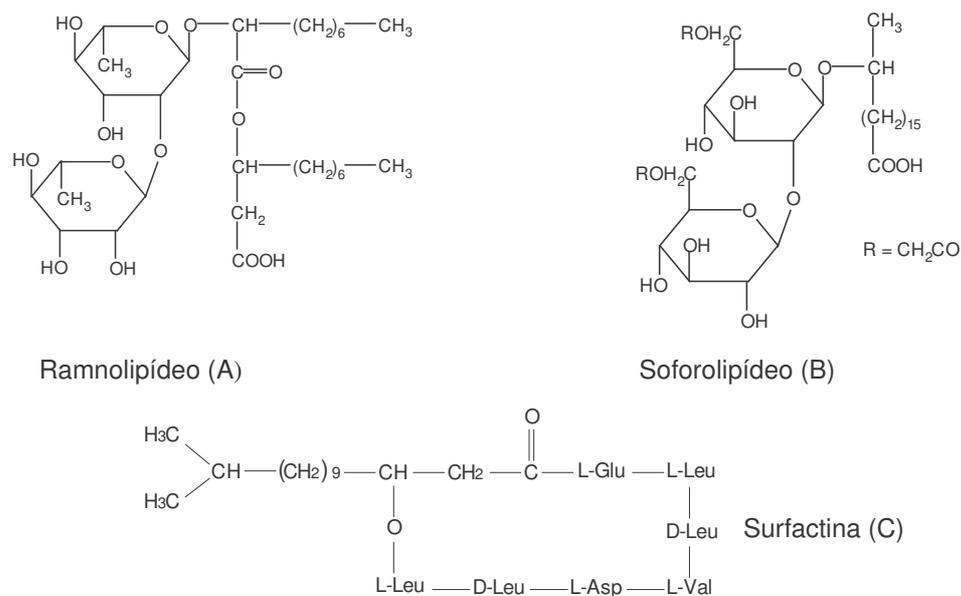


Figura 3.1. Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolípídeo (A e B) e lipopeptídeo (C).

O tipo de biossurfactante produzido pelo microrganismo é muito específico, podendo variar de espécie para espécie. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, produz ramnolípídeos, um biossurfactante do tipo glicolípídeo, e *P. fluorescens* produz viscosin, um lipopeptídeo. Além disso, a produção dos biossurfactantes geralmente ocorre como uma mistura de compostos

semelhantes. Foram identificados mais de 7 homólogos em culturas de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, mas dois são os compostos principais, ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, comumente conhecido como monoramnolípdeo, e ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, comumente conhecido como diramnolípdeo (ABALOS et al., 2001; MAIER, 2003).

Recentemente, BODOUR et al. (2004) identificaram uma nova classe de biossurfactantes chamada flavolípdeo produzido por *Flavobacterium*.

3.3. APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES

A maior área para a aplicação dos biossurfactantes é a indústria de óleo, tanto para a produção de petróleo como para incorporação nas formulações de óleo. Outras aplicações incluem biorremediação/dispersão de derramamento de óleo em solo e no mar, remoção de lodo de óleo de tanques de estocagem e aumento de recuperação de óleo (BANAT, MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

A biorremediação de petróleo é realizada por microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono. Esses microrganismos são capazes de degradar vários tipos de hidrocarbonetos – cadeia curta, cadeia longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Todos esses compostos possuem baixa solubilidade na água. Esse fato, aliado ao fato de que o primeiro passo na degradação de hidrocarbonetos envolve as oxigenases ligadas na membrana, torna essencial para a bactéria ter um contato direto com os hidrocarbonetos. Uma estratégia biológica para aumentar o contato entre a bactéria e o hidrocarboneto insolúvel na água é a emulsificação desse hidrocarboneto. Sendo assim, não é surpreendente que a bactéria que cresce no petróleo seja geralmente um emulsificador potente. Esses surfactantes ajudam na dispersão do óleo, aumentam a área superficial para o crescimento e ajudam liberar a bactéria da gota de óleo após a sua utilização (RON; ROSENBERG, 2002).

A formação de emulsões óleo em água (O/A) estáveis faz diluir o óleo na água aumentando a disponibilidade de nutrientes para o microrganismo. Em sistemas naturais incluindo solos, esse fenômeno pode ser utilizado para aumentar a população autóctone produtora de biossurfactante para produzir tais emulsões através da otimização das condições de crescimento (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

Os bioemulsificantes também podem ser adicionados nos ambientes para estimular o processo de biorremediação. *Acinetobacter radioresistens* que produz o bioemulsificante alasan não é capaz de usar hidrocarbonetos como fonte de carbono, mas foi adicionado numa mistura de bactérias degradadoras de óleo para aumentar a biorremediação. Isso acontece pela transferência horizontal do emulsificante da bactéria produtora para a bactéria heteróloga. Foi observado que o emulsificante alasan se ligou na superfície de *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 e *A. calcoaceticus* RAG-1 e mudou as propriedades superficiais desses microrganismos. Essa transferência horizontal de bioemulsificantes de uma espécie de bactéria para a outra tem implicações significativas nas comunidades microbianas, co-agregação e biofilmes (RON; ROSENBERG, 2001).

Jacobucci (2000) estudou a biorremediação de efluente de oficina e efluente de uma indústria de sabões e margarinas, localizados no Estado de São Paulo, utilizando as bactérias *Pantoea agglomerans* e *Planococcus citreus*, isoladamente e em consórcio e através da aplicação dos biossurfactantes produzidos por essas bactérias também de forma isolada e em consórcio. O efluente da oficina, um fluido oleoso de coloração preta, sofreu descoloração quando o consórcio de bactérias foi adicionado, passando para marrom. O efluente da indústria que apresentou coloração creme com espessa borra amarela oleosa foi clarificado após 72 h de crescimento bacteriano. Quando os biossurfactantes foram adicionados de forma isolada ao efluente da indústria, uma clarificação foi notada a partir de 24 h. No entanto, com a adição dos dois biossurfactantes simultaneamente nesse efluente, foi notada, além da clarificação da fase aquosa do efluente, uma emulsificação de grande parte da borra oleosa.

Foi observado também que a clarificação do efluente da indústria pode ser relacionada à maior redução da demanda química de oxigênio ocorrida para este efluente. Através da análise de cromatografia gasosa foi verificado que houve redução dos compostos oleosos dos efluentes.

Estudos de otimização de biorremediação de hidrocarbonetos foram propostos por Ron e Rosenberg (2002) associando os melhores microrganismos degradadores de óleo, o biossurfactante mais apropriado, o melhor produtor de bioemulsificante e a combinação mais efetiva destes.

Trabalhos que relatam estudos detalhados sobre a toxicidade de biossurfactantes são raros. Edwards, Lepo e Lewis (2003) compararam a toxicidade de biossurfactantes e surfactantes sintéticos empregados na remediação de óleo derramado no mar. Para a realização do teste de toxicidade foram utilizados *Menidia beryllina* e *Mysidopsis bahia*, peixe e crustáceo, respectivamente. Os biossurfactantes testados foram Emulsan um polímero heteropolissacarídeo produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 e BioEM um glicolípido de *Pseudomonas aeruginosa*. Entre os surfactantes sintéticos foi testado Triton X-100. Pela metodologia empregada os autores verificaram que não existe indicação consistente que uma classe particular de surfactantes, sintéticos ou biológicos, foi mais tóxico do que o outro. A toxicidade dos biossurfactantes foi considerada de forma geral intermediária quando comparada aos surfactantes sintéticos.

Alguns biossurfactantes além de suas propriedades detergentes, podem apresentar em concentração baixa, forte ação desestabilizante de membranas e assim, conferir propriedade antimicrobiana (CARILLO et al., 2003). O interesse inicial pelos biossurfactantes foi originado pela propriedade antimicrobiana. Os dois biossurfactantes mais bem estudados, ramnolípido e surfactina, foram primeiramente descritos na literatura em 1949 e 1968, respectivamente, por estas características (MAIER, 2003).

Bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos biossurfactantes do que as bactérias Gram-negativas, que são inibidas fracamente ou não são inibidas (LANG; KATSIWELA; WAGNER, 1989; KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002).

Candida bombicola e *C. apicola* produzem biossurfactantes do tipo glicolípido em grande quantidade. Esses glicolípidos (soforolípidos) inibem o crescimento de *B. subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecium* em concentrações de 6-29 mg/L. Outros glicolípidos inibem o crescimento não somente de bactérias Gram-positivas, mas também bactérias Gram-negativas tais como *Escherichia coli* e *Serratia marcescens*. Já o succinil-trealose-lípido inibe os vírus herpes simples e influenza a concentrações de 11-33 mg/L. Foi verificado também que esses biossurfactantes apresentam excelente atividade de inibição do crescimento de células de leucemia humana (K562, HL60, KU812) (KITAMOTO; ISODA; NAKAHARA, 2002).

Outro biossurfactante que apresenta atividade antiviral é a surfactina, produzido por *B. subtilis*. Essa atividade foi determinada em uma gama de viroses, tal como o vírus da herpes simples (HSV-1 e HSV-2) e o vírus da estomatite vesicular (VSV), mostrando uma grande eficiência devido à ruptura parcial da membrana lipídica e capsídeo do vírus. Desta forma, Vollenbroich et al. (1997) afirmam que a surfactina poderá ser utilizada em produtos farmacêuticos e biotecnológicos altamente seguros em relação à contaminação por vírus.

B. subtilis é reconhecido também como agente potente para controle biológico de doenças de plantas. Algumas linhagens de *B. subtilis* podem produzir três lipopeptídeos diferentes, surfactina, iturina e fengicina, enquanto outras, podem produzir somente um dos lipopeptídeos. Esses lipopeptídeos são capazes de modificar a hidrofobicidade superficial da bactéria e conseqüentemente a sua adesão em superfícies sólidas. Esse aspecto parece ser essencial para explicar as propriedades antifúngicas dos lipopeptídeos no controle biológico de fitopatologias (AHIMOU; JACQUES; DELEU, 2000).

Singht e Cameotra (2004) citam que os biossurfactantes são inibidores de biofilmes e que a surfactina diminui a formação de biofilmes formados por

Salmonella typhimurium, *S. enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* em cateteres.

Patentes têm sido requeridas, como por exemplo, para um biossurfactante produzido por *Candida* para uso na indústria têxtil, farmacêutica e cosmética. Os biossurfactantes podem ser utilizados na indústria têxtil como lubrificantes, durante a fiação dos filamentos hidrofóbicos na preparação das fibras e solubilizantes durante a tintura do tecido. A indústria farmacêutica tem se utilizado com sucesso dos biossurfactantes também na formulação de cosméticos, na dissolução de pigmentos e compostos oleosos biologicamente ativos. Outras áreas onde os biossurfactantes poderão ser utilizados são as indústrias de alimentos, na limpeza e sanitização das plantas de processamento de alimentos, na remoção de pesticidas e ceras de frutas e vegetais e na solubilização de óleos aromatizantes na fabricação de pães e sorvetes (KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1987).

3.4. PRODUÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

Vários seres vivos produzem biossurfactantes, entre eles os animais, as plantas e os microrganismos. Devido ao curto tempo de geração comparado ao crescimento animal e de plantas, a produção dos biossurfactantes por microrganismos é considerado mais promissor (LANG, 2002).

Microrganismos produtores de biossurfactante têm sido isolados de vários ambientes como solo, água do mar, sedimentos marinhos, etc. Um estudo realizado por Bodour, Drees e Maier (2003) mostrou que de 21 tipos de solos (não contaminados, contaminados com hidrocarbonetos, contaminado com metais, e contaminado com hidrocarbonetos e metais concomitantemente) 20 continham ao menos um microrganismo produtor de biossurfactante.

Na produção de agentes de superfície ativa microbiana pode-se utilizar substratos simples como n-alcanos, óleos vegetais, carboidratos ou resíduos

industriais. Mas, o seu custo de produção é um fator limitante para seu uso comercial. Alto custo de produção pode ser tolerado quando o biossurfactante é usado em pequenos volumes como em cosméticos e medicamentos. Mas quando são necessários grandes volumes como no caso da biorremediação, o alto custo fica incompatível com a sua aplicação (KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1987).

Os biossurfactantes que são produzidos em substratos miscíveis na água são considerados mais promissores em termos de custo de produção. Há uma grande variedade de substratos miscíveis alternativos que podem ser utilizados, como melão, soro de leite ou resíduos de destilarias. No entanto, resíduos hidrofóbicos como substratos baratos são difíceis de serem encontrados. Resíduo industrial da água do processamento de óleo de oliva, que contém 1-5% de óleo residual, é considerado um substrato apropriado para a produção de glicolipídeos (HABA et al., 2000). Outro substrato que pode ser promissor para a produção de biossurfactantes é óleo residual de fritura obtido após seu uso, já que é empregado em grande quantidade pela indústria de alimentos e no uso doméstico (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Haba et al. (2000) utilizaram 2% de óleo de fritura de oliva e girassol no meio de cultura para a produção de biossurfactante. Testaram 36 microrganismos e verificaram que o óleo de fritura de oliva foi o melhor para a produção de biossurfactante.

A maioria dos biossurfactantes é liberada no meio de cultura na fase exponencial de crescimento de microrganismos. Em certos casos o biossurfactante é produzido durante uma parte do ciclo de crescimento e então desativado ou incorporado em outro metabólito. Isso é observado quando *Bacillus licheniformes* é crescido em meio mínimo. O máximo do acúmulo do agente ativo ocorre na metade da fase exponencial e subseqüentemente decresce rapidamente, provavelmente porque é convertido em um metabólito sem atividade surfactante (GEORGIU; LIN; SHARMA, 1992).

As concentrações de biossurfactantes já obtidas foram 67 g/L de glicolipídeo produzido por *Torulopsis bombicola* (COOPER; PADDOCK, 1984), enquanto que de surfactina produzida pela bactéria *B. subtilis* havia sido obtido 0,8

g/L (COOPER et al., 1981). Mais recentemente há a citação da obtenção de 100g/L para ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas* (MAIER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Várias patentes já foram requeridas para processos de produção de biossurfactantes. A Showa Denko do Japão requereu uma patente para uma planta de produção de sal sódico de surfactina no ano de 2001 para uma produção de 30 toneladas/ano. Esse surfactante é usado como um ingrediente de cosméticos que possui baixa irritação da pele (BIOSURFACTANT..., 2001). Outra foi requerida pelo Institut Français du Petról para processo de produção de soforolípídeos em quantidades industriais para uso em cosméticos e detergentes (BOGNOLO, 1999).

3.5. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

A etapa de isolamento do biossurfactante representa custos consideráveis para sua produção. Existem métodos de isolamento de remoção contínuo ou descontínuo ao processo de fermentação. Os mais estudados e utilizados são os métodos descontínuos entre os quais se destaca a extração com solventes, como clorofórmio-metanol, acetato de etila e tetrahidrofurano, entre outros (ROCHA et al., 1992; IVSHINA et al., 1998; DESAI; BANAT, 1997).

O isolamento dos biossurfactantes também pode ser feito por precipitação através da acidificação com HCl (bastante utilizada para o isolamento da surfactina) (HOROWITZ; GILBERT.; GRIFFIN, 1990); da adição de sais à solução de biossurfactante, como sulfato de amônio (isolamento de Alasan de *Acinetobacter radioresistens*) (NAVON-VENEZIA et al., 1995) e adição de solventes miscíveis em água, tais como etanol ou acetona (PARASZKIEWICZ; KANWAL; DLUGONNSKI, 2002).

Outros métodos como a ultrafiltração também são citados para o isolamento de biossurfactantes (MULLIGAN; GIBBS, 1990).

Kim et al. (2000) citam a obtenção de dois tipos de biossurfactantes de uma espécie de *Nocardia*, ao mesmo tempo, dependendo do processo de isolamento utilizado (extração com solventes ou precipitação com sulfato de amônio). Obtiveram um tipo com fortes propriedades emulsificantes e outro com forte habilidade de redução da tensão superficial. Esses biossurfactantes ainda não haviam sido caracterizados quanto às propriedades químicas e físicas.

Cooper e Goldenberg (1987) já haviam verificado que dependendo do tipo de extração utilizado no caldo de cultura de *Bacillus cereus* (extração com clorofórmio ou ultrafiltração) foi obtido um polímero contendo D-glicosamina com boa atividade emulsificante ou uma mistura de homólogos de monoglicerídeos saturados com boa redução da tensão superficial.

Para a caracterização química do biossurfactante são utilizadas combinações de técnicas, desde a cromatografia em camada delgada a espectrometria de massas, infravermelho e ressonância magnética nuclear.

Na cromatografia em camada delgada são usados reveladores para lipídeos para identificação dos biossurfactantes. A surfactina, que é um lipopeptídeo apresentando 7 aminoácidos na sua composição, não apresenta reação quando revelada com ninhidrina (um revelador comum para aminoácidos) (KAKINUMA et al, 1969).

Bodour et al. (2004) ao descreverem uma nova classe de biossurfactantes produzido por *Flavobacterium* sp. fizeram uso de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e NOESY e espectrometria de massas ESI(+), ESI(-) e FAB(+). Os autores verificaram que o novo biossurfactante é uma mistura de 37 flavolipídeo com peso molecular de 584 a 686 e o maior componente foi determinado como: 4 -[[5 -(7 - metil - (E) - 2 - octenoilhidroxiamino) pentil] amino] - 2 - [2 - [[5 - (7 - metil - (E) - 2 - octenoilhidroxiamino) pentil] amino] -2 -oxoetil] - 2 - hidroxil - 4 - ácido oxobutanóico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS DA REGIÃO AMAZÔNICA

4.1.1. Microrganismos utilizados

Foram testados leveduras e fungos filamentosos provenientes da Região Amazônica (Urucu – AM), obtidas de borra de petróleo e solo de floresta. Dez gramas de solo foram diluídos em série em água destilada estéril e plaqueados em meio Sabouraud, segundo a técnica de spread-plate e incubado em temperatura ambiente por 7 dias. Da borra de petróleo foi inoculada 0,5 mL diretamente em meio Sabouraud, seguindo-se a técnica e condições de incubação anterior.

4.1.2. Preparo do inóculo

As leveduras foram inoculadas em ágar Sabouraud (Difco) e incubadas a 30 °C por 48 h para crescimento, e após este período, 5 alçadas de células foram transferidas para cada frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura base. Os fungos foram inoculados em PDA (Potato Dextrose Agar – Difco) e incubadas a 30 °C por 4 dias. Após crescimento, o meio de cultura sólido foi dividido em quadrados de 1cm e o micélio com os esporos foram transferidos para o meio líquido base na proporção de 5 quadrados de cada linhagem para 50 mL de meio de cultura.

4.1.3. Meio líquido base para produção de biossurfactante e condições de cultivo

A produção de biossurfactante foi feita em 50 mL de meio de cultura constituído de Mg SO₄. 7H₂O 0,5 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, NaNO₃ 3 g/L, extrato de

levedura 1 g/L e peptona 0,3 g/L, com pH ajustado em 5,0 (modificado de RAPP; BACKHAUS, 1992). Como fonte de carbono foi utilizado óleo diesel a 10% v/v.

O cultivo microbiano foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL a 30 °C em incubadora orbital (New Brunswick Scientific) com agitação constante de 150 rpm. As leveduras foram cultivadas por 11 e 15 dias e os fungos filamentosos por 12 e 20 dias. Frasco Erlenmeyer somente com 50 mL de meio de cultura e 10% de óleo diesel, sem inóculo, foi utilizado como controle.

Cada microrganismo foi crescido em quatro frascos Erlenmeyer. Após o período de incubação, os meios de cultura de dois frascos foram centrifugados a 16192 x g/15 minutos e congelados sem as células, por 24 h. Os meios de cultura de outros dois frascos foram congelados com as células durante 24 h e após esse período descongelados e centrifugados nas mesmas condições citadas acima.

4.1.4. Avaliação da produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes foi avaliada através da atividade de emulsificação do tipo A/O (água em óleo) e O/A (óleo em água). Para tanto, foi transferido para um tubo 3,5 mL do caldo de cultura livre de células e adicionado 2 mL do hidrocarboneto tolueno. Em outro tubo, adicionaram-se 2 mL de óleo diesel a 3,5 mL do caldo de cultura. Foi feita a medida da densidade óptica a 610 nm em espectrofotômetro a fim de se obter o valor do branco. Em seguida, cada tubo foi agitado vigorosamente em agitador de tubos (vortex) por 1 minuto. Após repouso de 1h seguiu-se novamente a medida de densidade óptica a 610 nm. A atividade de emulsificação do tipo óleo em água foi, então, determinada por $At_{emul} = Abst_{1h} - Abst_0$ (JOHNSON et al., 1992). Após 24 horas, a altura da emulsão água em óleo foi medida e expressa em centímetros (COOPER; GOLDENBERG, 1987).

Na Tabela 4.1 observa-se a qualificação da atividade emulsificante da amostra, conforme a altura da emulsão (tipo água em óleo) e densidade óptica (tipo óleo em água), levando em consideração a sensibilidade do equipamento utilizado.

Tabela 4.1. Convenção adotada para qualificar a atividade emulsificante.

ATIVIDADE EMULSIFICANTE	ALTURA DA EMULSÃO (TIPO ÁGUA EM ÓLEO)	DENSIDADE ÓPTICA _{610nm} (TIPO ÓLEO EM ÁGUA)
Alta	≥ 2cm	≥1,2
Moderada	de 1 a 1,9 cm	de 0,7 a 1,1
Baixa	< 1 cm	de 0,1 a 0,6

4.2. SELEÇÃO DA LINHAGEM MAIS EFICIENTE NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

4.2.1. Microrganismos utilizados:

Para determinar qual o microrganismo seria utilizado para estudos posteriores foram testados 14 microrganismos, dos quais 5 bactérias (*Pantoea agglomerans* - B1A, *Chromobacterium* sp. - 4, *Bacillus mycoides* - B3G, *Acinetobacter calcoaceticus* - 5C2, *Planococcus citreus* - 9), 5 basidiomicetos (*Agaricus campestris* - BAC, *Pleurotus* sp. - P1, *Phanerochaete chrysosporium* - BPC, *Pleurotus ostreatus* -BPOS, *Pleurotus* sp.- BPSCO), e 1 deuteromiceto (*Aspergillus niger* - A15), todos da Coleção de Culturas do LSFM e 3 leveduras (LB08, LB03, LB06) provenientes da Amazônia.

4.2.2. Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo, cada microrganismo foi cultivado no meio de cultura mais adequado para seu crescimento, sendo as bactérias inoculadas em Ágar Nutriente (24 h), leveduras em Ágar Sabouraud (3 dias) e os basidiomicetos (9 dias) e o deuteromiceto (3 dias) em Ágar Batata Dextrose. O inóculo utilizado para as bactérias e leveduras foi de 5 alçadas das células para 50 mL de meio líquido base contido em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Para os

fungos filamentosos foram utilizados 5 quadrados de 1 cm do micélio fúngico para 50 mL de meio de cultura.

4.2.3. Condições de cultivo:

A produção de biossurfactante foi realizada em meio líquido base descrito no item 4.1.3, com 10% de óleo diesel. O pH foi mantido em 5,0 para as leveduras e fungos filamentosos e em 6,8 para as bactérias. A temperatura de incubação foi de 30 °C em incubadora orbital (New Brunswick Scientific) com agitação constante de 150 rpm. Os tempos de coleta correspondem ao período de incubação para a produção de biossurfactante e estão citados na Tabela 4.2. Frasco Erlenmeyer somente com 50 mL de meio de cultura e 10% de óleo diesel, sem inóculo, foi considerado como controle.

Tabela 4.2. Período de incubação até a 1^a e 2^a coleta para a avaliação de produção de biossurfactante.

MICROORGANISMOS	1º COLETA	2º COLETA
Bactérias	1 dia	6 dias
Leveduras e deuteromiceto	2 dias	4 dias
Basidiomicetos	7 dias	18 dias

Após o período de incubação o caldo de cultura foi centrifugado a 16.192 x g por 15 minutos.

4.2.4. Avaliação da produção de biossurfactante

A avaliação da produção de biossurfactante foi feita através da atividade de emulsificação descrita no item 4.1.4 e pela medição da tensão superficial em tensiômetro Krüss, pelo método de anel de Du Nouy a 20 °C.

4.3. PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Planococcus citreus*

4.3.1. Avaliação do efeito do pH na produção

Para avaliação do efeito do pH na produção de biosurfactante foi utilizado o meio de cultura líquido citado no item 4.1.3, com 10% de óleo diesel. O pH foi ajustado em 7, 8 e 9.

4.3.1.1. Preparo do inóculo e condições de cultivo

A bactéria *P. citreus* (Figura 4.1) foi crescida por 72 h em placa com meio de cultura GYP (glicose 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L; peptona 10 g/L; ágar 20 g/L). Uma suspensão de células preparada em água destilada apresentando densidade óptica igual a 2 (610 nm) foi utilizada como inóculo. Para cada frasco Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido foi adicionado 1 mL da suspensão de células. O crescimento microbiano foi feito a 30 °C em incubadora orbital (New Brunswick Scientific), a 150 rpm. As amostras foram coletadas de 12h em 12h até 96h de incubação.



Figura 4.1. *Planococcus citreus* crescido no meio GYP durante 72h.

4.3.1.2. Avaliação da produção de biossurfactante

Após incubação, o caldo de cultura foi centrifugado a 16.192 x g por 15 minutos e mediu-se a tensão superficial do sobrenadante através de tensiômetro Krüss pelo método do anel de Du Nouy. A atividade emulsificante foi avaliada conforme item 4.1.4.

4.3.2. Produção e Isolamento do biossurfactante:

Para produção do biossurfactante foi utilizado o meio de cultura líquido citado no item 4.1.3, com pH ajustado em 7. Como fonte de carbono foi utilizado óleo diesel a 1% v/v. O inóculo foi preparado conforme item 4.3.1.2.

4.3.2.1. Condições de cultivo e isolamento do biossurfactante

Frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio de cultura foram incubados em incubadora orbital a 150 rpm, em uma temperatura de 30 °C por 72 h.

O caldo de cultura foi centrifugado a 16192 x g por 15 minutos, a 4 °C e filtrado em papel de filtro Whatman nº 1. Em seguida, foi extraído com clorofórmio:metanol ou precipitado com sulfato de amônio, conforme descrito abaixo:

Extração com clorofórmio:metanol

Para extração do biossurfactante do sobrenadante foi utilizado clorofórmio:metanol 2:1:3 (clorofórmio:metanol:sobrenadante). A espuma formada, contendo o biossurfactante foi separada em funil de separação e evaporada em temperatura ambiente em rotaevaporador Eyela. A amostra obtida foi congelada e liofilizada. Outra amostra, após extração com clorofórmio:metanol e evaporação, foi lavada duas vezes com hexano, numa tentativa de eliminar o máximo de resíduos de óleo diesel, ácido graxos livres e álcoois, que pudessem estar presentes no extrato bruto. Foi novamente evaporada, congelada e liofilizada.

Precipitação com Sulfato de Amônio

Adicionou-se sulfato de amônio ao sobrenadante até se atingir 65% da saturação. O material foi deixado em repouso por 24h a 4°C. Após esse período fez-se a centrifugação a 16192 x g por 15min. Foi feita a diálise da amostra com água deionizada por 24h, com trocas a cada 4h para a remoção do sal aderido ao biossurfactante. O precipitado foi recolhido e liofilizado (NAVON-VENEZIA et al.,1995).

4.3.3. Produção em fermentador:

Foi utilizado um fermentador BioFlo III (New Brunswick) com capacidade para 14L. O volume de trabalho foi de 7L de meio de cultura líquido (citado no item 4.1.3) com 1% de óleo diesel, pH 7, na temperatura de 30° C, agitação de 250 rpm e aeração de 0,3 vvm. O tempo de cultivo foi de 72h. O inóculo foi preparado conforme citado no item 4.3.1.1. Foi avaliada a concentração de biossurfactante obtida após extração com clorofórmio:metanol e por precipitação com sulfato de amônio, utilizando para cada método um litro de sobrenadante.

4.4. COMPARAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES ISOLADOS COM SURFACTANTES QUÍMICOS COMERCIAIS E SURFACTINA

Os biossurfactantes obtidos foram mantidos sob refrigeração a 4 °C, sendo realizados os testes a seguir:

4.4.1. Redução da Tensão Superficial

Foram testadas várias concentrações do biossurfactante produzido pela bactéria *P. citreus*, obtido por extração com clorofórmio:metanol (B9). A avaliação foi realizada através da medição da tensão superficial do biossurfactante dissolvido em água destilada na concentração de 10.000 mg/L, 9000, 8000, 7000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 100, 10 e 1mg/L. A análise foi feita em

tensiômetro Krüss pelo método de Du Nouy utilizando-se 10 mL de cada solução que estava a 20 °C. A fração obtida por sulfato de amônio (B9S) foi somente testada até a concentração de 200 mg/L.

Os surfactantes químicos Triton X-100[®] (t-octylphenoxypolyethoxyethanol)(Sigma), Niaproof[®](Sodium 7-ethyl-2-methyl-4-undecyl sulfate)(Sigma) e Span 20[®](Sorbitan monolaurate)(Sigma) foram utilizados nas concentrações de 100 µL/L, 500 µL/L e 500 µL/L, respectivamente. O biossurfactante Surfactin[®](Sigma) foi testado na concentração de 100 mg/L.

4.4.2. Atividade emulsificante

Foram testadas as atividades emulsificantes do biossurfactante B9, B9S, surfactantes químicos e surfactina. O biossurfactante B9 foi testado na concentração 1000, 100 e 10 mg/L. Os demais surfactantes foram testados nas concentrações citadas no item 4.4.1.

Fez-se a avaliação da atividade de emulsificação como descrito no item 4.1.4.

4.4.3. Toxicidade

Foi utilizado o bioensaio com sementes de *Latuca sativa* (alface) (DUTKA, 1989, modificado por DOS REIS-GORNY; DURRANT, 2003). Para cada surfactante testado foram utilizadas 50 sementes, em triplicata, colocadas em placas de Petri sobre discos de papel de filtro esterilizados. O biossurfactante B9 foi testado na concentração de 10.000 mg/L, 5000, 1000, 100 e 10 mg/L. Os surfactantes químicos Triton X-100, Niaproof e Span 20 e o biossurfactante surfactina e B9S foram utilizados nas concentrações citadas no item 4.4.1.

Foram utilizados 2 mL de cada amostra para embeber os discos de papel de filtro. As placas foram incubadas por 48h a temperatura ambiente no escuro. A avaliação do tamanho das raízes germinadas foi realizada com auxílio de papel

milimetrado. Para controle foi utilizada água destilada. A toxicidade foi obtida pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ efeito fitotóxico} = \frac{\text{comprimento médio CT}_{\text{H}_2\text{O}} - \text{comprimento médio amostra}}{\text{comprimento médio CT}_{\text{H}_2\text{O}}} \times 100$$

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSSURFACTANTES ISOLADOS

O biossurfactante B9 e B9S foram testados na concentração 10.000, 1000, 100 e 10 mg/L. Além do biossurfactante extraído foi testado também o sobrenadante, ou seja, o meio de cultivo sem as células bacterianas que foram removidas por meio de centrifugação. A atividade antimicrobiana foi desenvolvida conforme a metodologia descrita por Bauer et al. (1966).

A caracterização da atividade antimicrobiana foi feita com os microrganismos-teste citados na Tabela 4.3 com os meios de cultivo específicos em que foram inoculados, temperatura e período de incubação.

Tabela 4.3. Tabela com os microrganismos-teste com seus meios específicos, temperatura e período de incubação.

MICROORGANISMO	MEIO DE CULTURA	TEMPERATURA	TEMPO DE INCUBAÇÃO
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ágar Mueller-Hinton	37° C	24 h
<i>Bacillus cereus</i>	Ágar Mueller-Hinton	30° C	24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ágar Mueller-Hinton	37° C	24 h
<i>Escherichia coli</i>	Ágar Mueller-Hinton	37° C	24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ágar Mueller-Hinton	37° C	24 h
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Ágar Mueller-Hinton	30° C	48 h
<i>Candida albicans</i>	Ágar Sabouraud	37° C	48 h
<i>Aspergillus flavus</i>	Ágar Sabouraud	30° C	48 h

Foram utilizados 10 µL da solução de cada surfactante e transferido para um disco de papel (papel de filtro), com 6 mm de diâmetro, e introduzido em placas de Petri contendo, previamente, os microrganismos-teste, obtidos por uma suspensão de células padronizadas na concentração aproximada de $1,2 \times 10^6$ células/mL, semeados pela técnica de “spread-plate”. O teste foi realizado em triplicata para todas as linhagens.

Após o período de incubação dos microrganismos-teste, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição de cada disco.

4.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSURFACTANTES

4.6.1. Análise do extrato bruto por Cromatografia em Camada Delgada:

Para a realização da corrida cromatográfica foram utilizados 2,5 mg dos extratos brutos dissolvidos em 100 µL de metanol. Em seguida, 10 µL dessa solução foram aplicados em cada “spot” em placa de sílica gel 60 Merck. Como fase móvel foi utilizado clorofórmio:metanol:hidróxido de amônio 25% (65:25:4), como descrito por Horowitz et al. (1990). A corrida se deu por 90 minutos. Como revelador foi utilizado Rodamina 6G (0,005%) e visualização sob lâmpada UV (DITTMER; LESTER, 1964) – revelador universal de lipídios. A ninhidrina (0,2% em acetona) com visualização após aquecimento das placas a 100 °C por 5 minutos (DITTMER; LESTER, 1964) – revelador específico para grupos amino e ácido sulfúrico 6N com visualização após aquecimento a 100 °C (HOROWITZ et al, 1990) foram utilizados para verificar a presença de aminoácidos e outros compostos orgânicos possivelmente presentes no extrato bruto.

4.6.2. Espectrometria de Massas e no Infravermelho

Antes da caracterização química foi necessário isolar o biossurfactante. Para isso, utilizou-se uma placa de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck, com revelação por luz UV. Procedeu-se como citado no item 4.6.1. Com a luz UV foi visualizada a banda correspondente ao biossurfactante que foi coletada, ressuspensa com a mesma fase móvel e rotaevaporada. O material obtido foi então analisado por ESI(+)-MS usando um Espectrômetro de Massa de alta resolução Q-TOF, Micromass UK e FT-IR. Os espectros de infravermelho (IV) com transformada de Fourier (FT-IR) foram registrados em aparelho Nicolet Impact 410, utilizando-se celas de NaCl ou KBr, sendo os números onda expressos em cm⁻¹.

4.6.3. Espectrometria de Ressonância Magnética

Foi utilizado espectrômetro de Ressonância Magnética Varian Gemini-2000 (7,9 Tesla). Os valores de deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, tendo como padrão interno tetrametilsilano (TMS) para os espectros de ¹H-RMN.

Nesse trabalho a caracterização dos biossurfactantes foi realizada em colaboração com o Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP.

4.7. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO BIOSSURFACTANTE

O extrato bruto liofilizado (B9) foi avaliado aos 4, 8 e 12 meses de estocagem, quanto à manutenção da atividade emulsificante, redução da tensão superficial, e toxicidade, conforme metodologia descrita no item 4.1.4, 4.2.4 e 4.4.3, respectivamente. Essas avaliações foram feitas dissolvendo-se o biossurfactante em água destilada na concentração de 10000, 1000 e 100 mg/L.

4.8. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR *Planococcus citreus*

4.8.1. Composição dos meios de cultura

A) Meio Cooper (COOPER; PADDOCK, 1984)

Óleo diesel.....	10% v/v
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄	5g
CaCl ₂	0,1g
NaCl.....	0,1g
Glicose.....	10g
Extrato de levedura.....	1g
Uréia.....	0,1g
Água destilada.....	1000 mL
pH ajustado para 6,8	

Este meio foi testado com 1% de glicose (Meio C - 1%glicose), 0,1% de glicose (Meio C- 0,1% glicose) e 0% de glicose (Meio C – 0% de glicose). Como substrato oleoso foi testado também 1% de óleo diesel, 1% e 10% de resíduo oleoso após processo de fritura com óleo de soja (óleo residual de fritura), obtido de uma grande rede de lanchonetes.

B) Meio Robert (**Meio R**) (ROBERT et al., 1989)

Óleo residual de fritura.....	1% v/v
NaNO ₃	4g
KCl.....	0,1g
KH ₂ PO ₄	0,5g
K ₂ HPO ₄	1g
CaCl ₂	0,01g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01g

Extrato de levedura.....0,1g
Solução traço0,05 mL
 B (H_3BO_3) – 0,026%
 Cu ($CuSO_4$) – 0,05%
 Mn ($MnSO_4$) – 0,05%
 Mo (Na_2MoO_4) – 0,006%
 Zn ($ZnSO_4$) – 0,07%
Água destilada.....1000mL
pH final 6,8

C) Meio Kim (**Meio K**) (KIM et al., 2000)

Óleo residual de fritura.....1% v/v
NaNO₃.....1g
KH₂PO₄0,1g
MgSO₄.7H₂O.....0,1g
CaCl₂.....0,1g
Extrato de levedura.....0,2g
Água destilada.....1000 mL
pH final 6,7

4.8.2. Preparo do inóculo:

Conforme descrito no item 4.3.1.1.

4.8.3. Condições de cultivo:

A temperatura de incubação foi a 30 °C em incubadora orbital (New Brunswick Scientific), a 150 rpm. As amostras foram coletadas até 96h de incubação quando foi utilizado somente óleo diesel e até 120 h quando utilizado o óleo residual de fritura.

4.8.4. Avaliação dos ensaios realizados:

Os ensaios foram avaliados através da medição da tensão superficial e da avaliação da atividade emulsificante conforme descrito no item 4.1.4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS DA REGIÃO AMAZÔNICA

Foram testadas 37 linhagens fúngicas provenientes da Região Amazônica, sendo 26 fungos filamentosos e 11 leveduras, obtidas de solo e de borra oleosa da Região de Urucu no Estado do Amazonas.

Seis linhagens de leveduras apresentaram uma atividade emulsificante moderada a alta do tipo água em óleo, conforme pode ser observado na Tabela 5.1, com emulsões chegando a medir de 1,8 a 2,3 cm. Destacaram-se as linhagens LB 03 e LB 08 por emulsificar todo o tolueno e o óleo diesel, apresentando portanto, emulsões iguais ou maiores que 2,0 cm.

Foi obtida somente uma atividade emulsificante moderada do tipo óleo em água. O máximo de atividade produzido foi uma densidade óptica de 0,93 pela levedura LB01.

Tabela 5.1. Atividade de emulsificação das 11 linhagens de leveduras provenientes da Região Amazônica, obtidas de borra oleosa.

LINHAGEM/ SUBSTRATO		ATIVIDADE DE EMUSIFICAÇÃO							
		Densidade óptica				Altura da emulsão (cm)			
		1ª coleta*		2ª coleta**		1ª coleta		2ª coleta	
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
LB 01	T	0,93	0,08	0,78	0,21	0,2	0,3	0,4	0,3
	D	0,20	0,0	0,07	0,0	0,1	0	0	0
LB 02	T	0,32	0,20	0,75	0,24	0,5	0,2	0,3	0,4
	D	0,04	0	0	0	0	0	0,2	0,2
LB 03	T	0,13	0,02	0,28	0,06	1,8	2,3	2,2	0,1
	D	0,14	0,44	0,06	0	1,7	1,6	2,0	0
LB 04	T	0,10	0,16	0,14	0,09	0	0	0	0,1
	D	0,09	0,02	0	0,02	0	0	0	0,1

Tabela 5.1 (Continuação)

LINHAGEM/ SUBSTRATO		ATIVIDADE DE EMUSIFICAÇÃO							
		Densidade óptica				Altura da emulsão (cm)			
		1 ^a coleta*		2 ^a coleta**		1 ^a coleta		2 ^a coleta	
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
LB 05	T	0,54	0,10	0,05	0,02	0	0	0,4	0,3
	D	0,44	0	0,01	0	0	0	0,3	0
LB 06	T	0,01	0,2	0,03	0,02	1,8	1,6	2,2	0,1
	D	0,14	0,01	0	0,05	1,6	1,9	0,2	0,1
LB 07	T	0,15	0,08	0,07	0,02	2,0	0,2	0,1	1,6
	D	0,51	0,06	0,01	0	0,3	0,1	0	1,0
LB 08	T	0,22	0,55	0,34	0,25	1,5	2,1	0,1	0,1
	D	0,15	0	0,06	0	0,1	2,0	0,1	0
LB 09	T	0,13	0,05	0,12	0,23	1,8	0,3	2,2	0
	D	0	0	0,01	0,05	0,3	0,3	0,2	0
LB 10	T	0,15	0,09	0,13	0,06	0,5	0,1	0,1	0,2
	D	0,01	0,03	0,04	0	0,1	0	0	0
LB 11	T	0,49	0,43	0,02	0,16	2,3	1,8	0,5	0,2
	D	0,25	0,08	0	0	1,0	0,7	0	0

a= sobrenadante congelado com as células; *b*= sobrenadante congelado sem as células; T= Tolueno; D= Óleo Diesel
* = 11 dias ** 15 dias

O procedimento de congelamento do sobrenadante com as células foi realizado com propósito de facilitar a liberação de algum biossurfactante que estivesse sendo produzido na parede celular do microrganismo e assim, permitir sua detecção. Na maioria das leveduras testadas não se verificou resultado diferente quando se avaliou o sobrenadante congelado com ou sem as células. No entanto, as leveduras LB 01 e LB 09, apresentaram atividade emulsificante moderada e alta, respectivamente, somente com o sobrenadante congelado com as células.

As 26 linhagens de fungos filamentosos citadas na Tabela 5.2 apresentaram resultados baixos de atividade de emulsificação do tipo óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), quando comparados com os resultados obtidos com as leveduras provenientes da Região Amazônica.

Tabela 5.2. Atividade de emulsificação das 26 linhagens de fungos filamentosos provenientes da Região Amazônica, obtidas de borra oleosa e solo.

LINHAGEM/ SUBSTRATO		ATIVIDADE DE EMUSIFICAÇÃO							
		Densidade óptica				Altura da emulsão (cm)			
		1ª coleta*		2ª coleta**		1ª coleta		2ª coleta	
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
FB 01	T	0,05	0,23	0,13	0,15	0	0	0	0
	D	0,13	0,08	0,01	0,08	0	0	0	0
FS 02	T	0,18	0,38	0,32	0,21	0	0	0	0
	D	0,02	0,02	0,18	0,13	0	0	0	0
FS 03	T	0,16	0,24	0,34	0,45	0	0	0	0
	D	0,10	0	0,13	0,11	0	0	0	0
FS 04	T	0,05	0,20	0,09	0,29	0	0	0	0
	D	0,01	0,06	0,06	0,01	0	0	0	0
FS 05	T	0,05	0,17	0,05	0,21	0	0	0	0
	D	0,10	0,04	0,04	0,02	0	0	0	0
FB 06	T	0,10	0,14	0,12	0,07	0	0	0	0
	D	0,03	0,28	0,10	0,04	0	0	0	0
FS 07	T	0,06	0,10	0,14	0,16	0	0	0	0
	D	0,04	0,10	0,29	0,04	0	0	0	0
FS 08	T	0,13	0,11	0,33	0,32	0	0	0	0
	D	0,02	0,01	0,04	0,16	0	0	0	0
FS 09	T	0,10	0,15	0,10	0,12	0	0	0	0
	D	0,03	0,09	0,10	0,06	0	0	0	0
FS 10	T	0,08	0,09	0,13	0,17	0	0	0	0
	D	0,02	0,02	0	0,03	0	0	0	0
FB 11	T	0,05	0,12	0,07	0,07	0,7	0	0	0
	D	0,02	0,03	0,18	0,04	0	0	0	0
FS 12	T	0,12	0,17	0	0,13	0	0	0	0
	D	0	0,06	0	0,05	0	0	0	0
FS 13	T	0,20	0,21	0,12	0,13	0	0	0	0
	D	0,17	0,35	0,21	0,04	0	0	0	0

Tabela 5.2 (Continuação)

LINHAGEM/ SUBSTRATO		ATIVIDADE DE EMUSIFICAÇÃO							
		Densidade óptica				Altura da emulsão (cm)			
		1ª coleta*		2ª coleta**		1ª coleta		2ª coleta	
		a	b	a	b	a	b	a	b
FS 14	T	0,03	0,17	0,03	0,08	0	0	0	0
	D	0,04	0,02	0,01	0,07	0	0	0	0
FS 15	T	0,28	0,24	0,34	0,27	0,3	0	0,3	0,5
	D	0,01	0,18	0,24	0,22	0	0	0	0
FB 16	T	0,20	0,15	0,15	0,19	0	0	0	0
	D	0,11	0,09	0	0,20	0	0	0	0
FS 17	T	0,07	0,12	0,10	0,23	0	0	0	0
	D	0,04	0,10	0,03	0,04	0	0	0	0
FS 18	T	0,06	0,26	0,12	0,13	0,4	0	0	0
	D	0,01	0,07	0,08	0,16	0	0	0	0
FS 19	T	0,15	0,17	0,17	0,17	0	0	0	0
	D	0,15	0,35	0,15	0,13	0	0	0	0
FS 20	T	0,20	0,23	0,16	0,22	0,7	0	0	1,3
	D	0,03	0,03	0,02	0,05	0,7	0	0	0
FB 21	T	0,08	0,18	0,09	0,07	0	0	0	0
	D	0,17	0	0,02	0,02	0	0	0	0
FS 22	T	0,06	0,07	0,11	0,08	0	0	0,3	0,3
	D	0,10	0,03	0,03	0,05	0	0	1,2	0
FS 23	T	0,05	0,18	0,04	0,02	0,3	0	0	0,4
	D	0,02	0,26	0,05	0,08	0	0	0	0
FS 24	T	0,22	0,46	0,18	0,19	0	0	0	0
	D	0,04	0,05	0,02	0,06	0	0,5	0	0
FS 25	T	0,02	0,17	0,07	0,09	0,2	0	0,2	0
	D	0,07	0,23	0,01	0,16	0	0	0	0
FB 26	T	0,07	0,02	0,10	0,20	0	0	0	0
	D	0,08	0,75	0,21	0,27	0	0	0	0

FS = fungo filamentoso proveniente de solo
 FB = fungo filamentoso proveniente de borra oleosa
 T = Tolueno D = Óleo Diesel

a = sobrenadante congelado com as células
 b = sobrenadante congelado sem as células
 * = 12 dias ** = 20 dias

As melhores atividades do tipo A/O observadas neste experimento foram produzidos pelos fungos filamentosos FS 20 e FS 22 com a formação de uma emulsão de 1,3 cm e 1,2 cm de altura, respectivamente. Mas, as leveduras da Amazônia, testadas anteriormente, chegaram a apresentar uma emulsão com 2,3 cm de altura. Quanto à atividade do tipo O/A, o fungo filamentoso FB 26 chegou a apresentar 0,75 de densidade óptica, já o meio fermentado pela levedura LB 01 apresentou densidade óptica de 0,93. Carvalho, Marchi e Durrant (1997) obtiveram com a bactéria *Planococcus citreus* a densidade óptica de 1,8.

De fato, fungos filamentosos produtores de biossurfactantes são raros quando comparados ao número de bactérias e leveduras citadas na literatura (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; BANAT, 2000; DESAI; BANAT, 1997; KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1987).

Carvalho, Marchi e Durrant (1997) obtiveram com *Aspergillus niger* crescido em meio de cultura com 1,5% de óleo de oliva e em 1,5% de tolueno, uma emulsão de 2 cm em ambos os casos.

Cladosporium resinae é outro fungo filamentoso citado como produtor de biossurfactante, freqüentemente encontrado crescendo em combustível (MURIEL et al., 1996). Esta correlação não foi observada neste trabalho, já que os fungos filamentosos isolados da borra oleosa não apresentaram melhores resultados do que os isolados do solo.

Muriel et al. (1996) utilizaram a condição estática para *C. resinae*. A agitação ou a adição de ar resultou em menor crescimento do fungo filamentoso.

Os fungos filamentosos produzem proteínas chamadas hidrofobinas que tem a função de auxiliar as hifas a escapar em seus substratos para o ar, auxiliando, portanto no crescimento do fungo através da redução da tensão superficial da água (VEGT et al., 1996). Essa função é corroborada pela observação de que fungos que não formam hifas verdadeiras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) não formam hidrofobinas (WHITEFORD; SPANU, 2002). Essas hidrofobinas também são produzidas pelas bactérias filamentosas, os actinomicetos, como por exemplo, *Streptomyces tendae* que é produtor da

streptofactina (TILLOTSON et al., 1998). A hidrofobina produzida pelo basidiomiceto *Schizophyllum commune* SC3 (20-100 µg/mL) reduz a tensão superficial da água de 72 para 24 mJ m⁻², fazendo com que a SC3 seja a proteína com maior poder de redução de tensão superficial, já reportada (WÖSTEN et al., 1999).

Foram consideradas para estudos posteriores as linhagens que apresentaram emulsões iguais ou superiores a 2,0 cm na presença de tolueno e óleo diesel. Pelas atividades de emulsificação apresentadas, os fungos filamentosos não foram utilizados para os estudos a seguir, já que as leveduras, também provenientes da Região Amazônica, mostraram resultados mais promissores.

5.2. SELEÇÃO DA LINHAGEM MAIS EFICIENTE NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Entre os 14 microrganismos testados, as bactérias *Pantoea agglomerans* (B1A), *Chromobacterium* sp. (4), *Planococcus citreus* (9), *Acinetobacter calcoaceticus* (5C2), *Bacillus mycoides* (B3G) e o deuteromiceto *Aspergillus niger* (A15) da Coleção de Culturas do LSFM/UNICAMP já haviam sido testados por Carvalho, Marchi e Durrant (1997) quanto à atividade de emulsificação, em meio de cultura líquido com uma concentração do substrato oleoso (tolueno, vaselina, óleo de oliva e querosene) a 1,5%, 3% e 5%. Os microrganismos apresentaram atividade do tipo O/A ou A/O com emulsões iguais a 2 cm ou superior ou ainda densidade óptica igual a 1,8 ou superior. Dessa forma, foram selecionados para serem testados juntamente com as leveduras da Região Amazônica que apresentaram também emulsões iguais a 2 cm ou superior.

Cinco basidiomicetos da Coleção de Culturas do LSFM/UNICAMP também foram incluídos neste experimento a fim de serem testados quanto à produção de biossurfactantes, já que foram microrganismos utilizados em

experimentos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e de degradação de polietileno tereftalato (PET), produto proveniente do petróleo.

Todos os microrganismos foram submetidos a um crescimento em óleo diesel a 10% e os resultados obtidos citados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Medida de tensão superficial e atividade de emulsificação dos 14 microrganismos testados quanto à produção de biossurfactante em óleo diesel 10%.

MICRORGANISMO	TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m)		DENSIDADE ÓPTICA		ALTURA DA EMULSÃO (cm)	
	1 ^a coleta*	2 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta
B1A	42,2	41,5	1,2	1,5	0,3	0,2
4	50,7	50	0,1	0,1	0,2	0,4
B3G	45,9	46,3	0,5	0,7	2,3	1,7
5C2	48,2	48,4	0,4	0,6	0	0,3
9	34,2	34,8	2,0	2,0	0	0
A15	50,9	50,1	0,1	0,1	0,2	0,8
BAC	48,8	49,8	0,1	0	1,6	1,6
P1	46,1	45,8	0,1	0,1	0	0,3
BPC	50,9	49,9	0	0	0,5	0,2
BPOS	50,1	48,4	0,2	0,1	0	0
BPSCO	48,4	48,4	0,1	0,1	0	0
LB08	44,8	44,2	0,1	0,1	1,8	1,5
LB03	46,4	47,4	0,3	0,3	2,0	1,2
LB06	47,1	48,9	0,2	0,3	1,0	0
Controle	51,4	50	0,2	0,2	0	0

H₂O destilada: 71,7 mN/m * Período de coleta – Tabela 4.2

A bactéria *Planococcus citreus* (9) foi a que apresentou o melhor resultado entre os microrganismos testados quanto à tensão superficial, baixando-a de 51,4 mN/m (controle) para 34,2 mN/m na 1^a coleta, acompanhada de uma alta atividade de emulsificação do tipo óleo em água com densidade óptica 2, enquadrando-se perfeitamente no conceito de biossurfactante como um composto microbiano que exibe alta atividade surfactante e atividade emulsificante (BANAT;

MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Pode-se sugerir que o biossurfactante produzido por *P. citreus* seja hidrofílico, pela sua tendência de se concentrar na fase aquosa (KOSARIC; CAIRNS e GRAY, 1987), observado pela alta atividade emulsificante do tipo óleo em água, ou seja, alta densidade óptica e sem nenhuma formação de emulsão água em óleo.

Pantoea agglomerans causou a queda da tensão superficial de 50 mN/m até 41,5 mN/m e apresentou densidade óptica 1,5 na 2ª coleta. Esse resultado demonstra que este microrganismo conseguiu baixar a tensão superficial em 8,5 unidades, enquanto a bactéria 9 baixou a tensão superficial em 17,2 unidades. Além disso, o B1A é um microrganismo bastante instável fisiologicamente apresentando resultados muito bons em certos experimentos e em outros não apresenta o mesmo desempenho, fato também observado por Kushida (2000). *P. citreus*, pelo contrário, foi constante na produção de biossurfactante.

Os demais microrganismos testados não apresentaram bons resultados quanto à diminuição da tensão superficial. No entanto, a bactéria B3G, o basidiomiceto BAC e as leveduras apresentaram alta atividade emulsificante, demonstrando que houve a produção de emulsificantes.

De acordo com os resultados apresentados acima, a bactéria *Planococcus citreus* foi o microrganismo selecionado para os estudos posteriores.

5.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Planococcus citreus* :

5.3.1. Avaliação do efeito do pH na produção do biossurfactante:

Sabe-se que o pH ótimo para o crescimento da bactéria *P. citreus* é o pH neutro (CLAUS et al., 1992) e que o pH ácido tem efeito negativo sobre a estabilidade das emulsões produzidas por *P. citreus*. Kushida (2000) obteve esses resultados estudando a influência do pH sobre a estabilidade das emulsões e verificou que a maior atividade é mantida na faixa que varia da neutralidade a alcalinidade. Devido a esses dados estudou-se o efeito do pH na faixa de 7 a 9.

A bactéria *P. citreus* quando crescida em meio líquido com 10% de óleo diesel e pH 7 emulsificou toda a porção do óleo, conforme pode ser observado na Figura 5.1.



Figura 5.1. Bactéria *Planococcus citreus* crescida em meio de cultura com 10% de óleo diesel, pH 7, por 60 horas, com emulsificação de todo o óleo.

O meio com pH 9 não produz redução em mais de uma unidade na tensão superficial. Já, os meios com pH 7 e 8 reduziram a tensão superficial praticamente na mesma quantidade, ocorrendo a maior redução em 60h para o pH 8 e 72h para o pH 7. Em 84h de cultivo ocorreu tanto no meio com pH 7 como no meio com pH 8 perda da atividade de redução da tensão superficial, havendo um aumento novamente em 96h de cultivo (Figura 5.2).

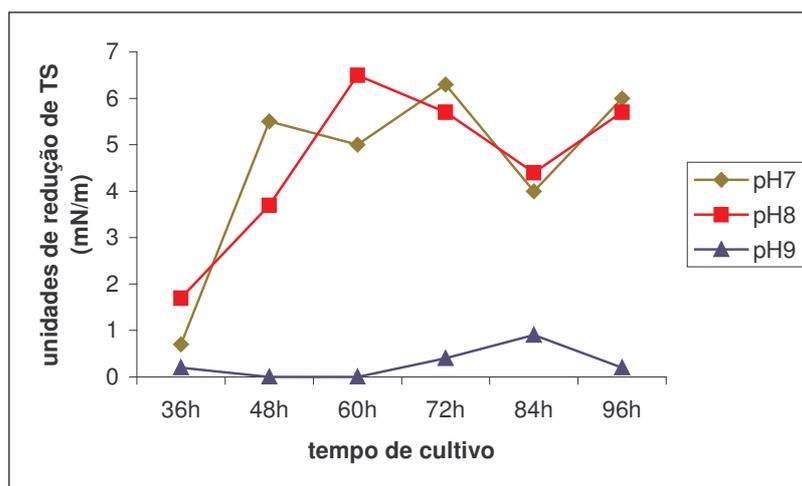


Figura 5.2. Curva de redução da tensão superficial do meio para *P. citreus* crescido durante 96h em diferentes valores de pH.

Essa oscilação da produção de biossurfactantes foi observada também por outros autores. Georgiou, Lin e Sharma (1992) observaram que o biossurfactante de *Bacillus licheniformes* é produzido ao máximo até a metade da fase exponencial e subseqüentemente decresce rapidamente, provavelmente porque é convertido em um metabólito sem atividade surfactante. Kushida (2000) sugere que a oscilação possa ser devido ao consumo do biossurfactante produzido pelo microrganismo, preferencialmente ao substrato oleoso.

Fazendo-se a análise da emulsão (Figura 5.3) observou-se que o melhor resultado foi obtido em 60 e 72h para o meio com pH 7. Para o meio com pH 8 houve estabilidade da emulsão durante o período de 60 à 84h. O meio com pH 9 apresentou as emulsões mais fracas entre os valores de pH testados, assim como apresentou também quase nenhuma redução na tensão superficial.

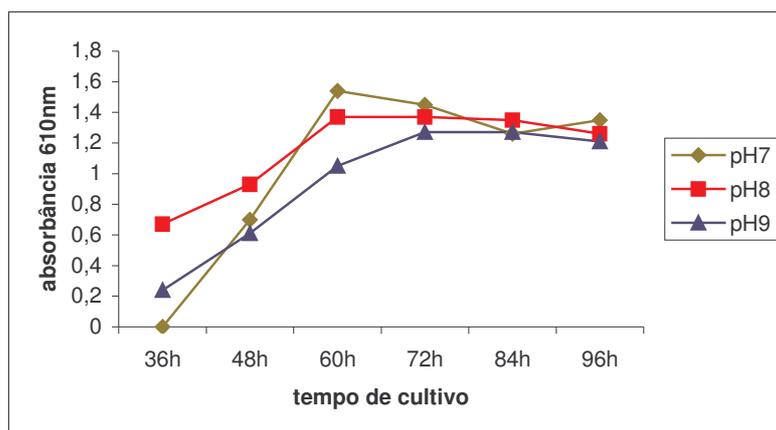


Figura 5.3. Atividade emulsificante do tipo O/A apresentado por *P. citreus*, crescido durante 96h em meio com diferentes valores de pH.

5.3.2. Produção e isolamento do biossurfactante:

O sobrenadante do meio fermentado usado no crescimento da bactéria *P. citreus* foi submetido à extração com clorofórmio:metanol. Nas duas fases bem distintas formadas, se observou na fase do clorofórmio (fase inferior) a formação de muita espuma, que foi coletada para ser evaporada, conforme descrito no item 4.3.2.1.

Foi obtido 0,28 g/L de extrato bruto após o processo de liofilização. Kushida (2000) obteve uma concentração de 0,38 g/L com *P. citreus* crescido em meio contendo 1,5% de óleo de oliva.

P. citreus crescido em meio líquido produz boa redução da tensão superficial do meio e analisando-se a atividade emulsificante do sobrenadante observou-se a formação da emulsão do tipo O/A (Figura 5.4). Essas mesmas características são apresentadas pelo extrato bruto obtido através da extração com clorofórmio:metanol.



Figura 5.4. Emulsão O/A obtida com o sobrenadante do meio com *P. citreus* após 72 h – A: controle; B: amostra.

No entanto, quando foi realizado um trabalho de avaliação de diferentes metodologias para isolamento de biossurfactantes produzidos por bactérias e leveduras, inclusive *P. citreus*, verificou-se que esta bactéria produz outro tipo de biossurfactante (COELHO; JACKISCH-MATSUURA; DURRANT, 2004). Utilizando precipitação com sulfato de amônio para o isolamento foi obtido um biossurfactante com alta atividade emulsificante do tipo água em óleo (A/O). Outros métodos testados como precipitação ácida com HCl e precipitação com adição de acetona não foram apropriados para o isolamento de biossurfactante de *P. citreus*.

Kim et al. (2000) observaram resultado semelhante quando estudaram a produção de biossurfactante por *Nocardia* sp. Dependendo do processo de isolamento utilizado, extração com solventes ou precipitação com sulfato de amônio, obtiveram um tipo com fortes propriedades emulsificantes e outro com forte habilidade de redução da tensão superficial. Esses biossurfactantes ainda não haviam sido caracterizados quanto às propriedades químicas e físicas. Cooper e Goldenberg (1987) já haviam verificado que, dependendo do tipo de extração empregado para o caldo de cultura de *Bacillus cereus* (extração com clorofórmio ou ultrafiltração) foi obtido um polímero contendo D-glicosamina com boa atividade emulsificante ou uma mistura de homólogos de monoglicerídeos saturados com boa redução da tensão superficial.

Paraszkiewicz, Kanwal e Dlugonski (2002) estudando o emulsificante produzido pelo fungo filamentoso *Curvularia lunata*, citam que há formação de dois tipos de emulsão, água em óleo e óleo em água, dependendo da fase de crescimento do fungo. Barriga et al. (1999) verificaram que o emulsificante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* contém ao menos dois tipos de polímeros com diferentes composições químicas e propriedades emulsificantes. Um parece ser responsável pelas propriedades emulsificantes do extrato bruto, enquanto outro, aumenta a estabilidade da emulsão.

Como se observa pelas citações acima, a produção de diferentes tipos de biossurfactantes pelo mesmo microrganismo não é característica de um único grupo, já que há citação para actinomicetos, bactérias não filamentosas, fungos filamentosos e leveduras.

Sabe-se que o tipo de emulsão formada depende da estrutura do surfactante, ou seja, da proporção entre os grupos lipofílicos e hidrofílicos presentes na molécula. Essa relação é expressa como balanço hidrofílico-lipofílico (HBL). O HBL indica quando um surfactante irá formar uma emulsão do tipo A/O ou O/A. Biossurfactantes com valores abaixo de 6 favorecem a estabilização de emulsões do tipo A/O, ou seja, esses biossurfactantes são lipofílicos e

biossurfactantes com valores entre 10 a 18 tem o efeito oposto, formando emulsificações do tipo O/A e sendo hidrofílicos (DESAI; BANAT, 1997).

Os extratos brutos obtidos pelos dois métodos de isolamento (Figura 5.5) são muito semelhantes macroscopicamente. O extrato obtido com clorofórmio:metanol (B9) apresentou coloração amarelada (Figura 5.5 A), enquanto o extrato obtido por sulfato de amônio (B9S) apresentou coloração acinzentada (Figura 5.5 B). A concentração obtida por precipitação com sulfato de amônio foi de 0,11 g/L.

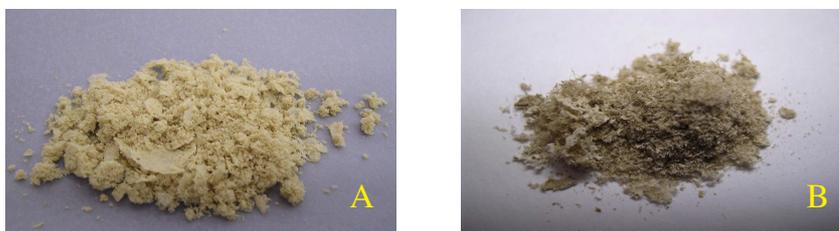


Figura 5.5. Extrato bruto de biossurfactantes produzidos por *P. citreus*: A - extração com clorofórmio:metanol; B - precipitação com sulfato de amônio.

Nenhuma referência foi encontrada citando *Planococcus* como produtor de biossurfactante. No entanto, Engelhardt et al. (2001) citam esse gênero como degradador de hidrocarbonetos de óleo cru.

5.3.3. Produção em fermentador:

Após 72 h de cultivo de *P. citreus*, o caldo de cultura foi coletado e o biossurfactante isolado através da extração com clorofórmio:metanol e com sulfato de amônio. Obteve-se concentração de 0,53 g/L com a extração com solventes e 0,031 g/L com o sulfato de amônio. Observou-se também que houve redução no pH após 24 h de crescimento para 6,74, aumentando para 7,08 em 48 h e para 7,71 em 72 h, quando foi coletado o caldo de cultura.

Com a produção desse biossurfactante em fermentador conseguiu-se um aumento na concentração de 0,28 g/L para 0,53 g/L, utilizando-se extração com solventes. O mesmo não foi observado utilizando-se precipitação com sulfato de amônio, já que havia sido obtido 0,11 g/L, após crescimento em frascos Erlenmeyer.

A otimização da produção é o grande desafio na área de biossurfactantes. Bons biossurfactantes continuam sendo descobertos como, por exemplo, o flavolipídeo produzido por *Flavobacterium* sp., que reduz a tensão superficial a 26 mN/m, mas sua produção é de 0,05 a 0,1g/L (BODOUR et al., 2004). Outros já descobertos há quase 40 anos, como a surfactina, ainda têm estudos de otimização para aumento de sua produção (COOPER et al., 1981; SEN, 1997; SEN; SWAMINATHAN, 1997; WEI; CHU, 1998; FOX; BALA, 2000).

As leveduras parecem ser os microrganismos mais promissores em termos de rendimento na produção de biossurfactantes. Cooper e Paddock (1984) citam a obtenção da concentração final de 67 g/L de glicolipídeo produzido por *Torulopsis bombicola*, enquanto que de surfactina produzida pela bactéria *B. subtilis* havia sido obtido 0,8 g/L (COOPER et al., 1981).

5.4. COMPARAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES ISOLADOS COM SURFACTANTES QUÍMICOS COMERCIAIS E SURFACTINA

5.4.1. Redução da tensão superficial

O biossurfactante liofilizado B9 obtido por extração com clorofórmio:metanol, conseguiu baixar a tensão superficial da água de 70,6 mN/m para 38 mN/m conforme pode ser visto na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Avaliação da tensão superficial da água a 20 °C com diferentes concentrações de biossurfactante liofilizado B9

B9* (mg/L)	TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m)
10.000	38,0
9.000	38,8
8.000	39,4
7.000	40,2
6.000	40,6
5.000	41,5
4.000	42,2
3.000	46,1
2.000	48,4
1.000	50,7
100	62,4
10	70,3
1	70,3

*biossurfactante extraído com clorofórmio:metanol

Comparando-se o biossurfactante liofilizado B9 com os surfactantes comerciais (Tabela 5.5), observa-se uma diferença muito grande em relação à quantidade necessária para uma boa redução da tensão superficial da água.

Tabela 5.5. Avaliação da tensão superficial da água a 20 °C com diferentes surfactantes químicos e o biossurfactante surfactina

SURFACTANTES COMERCIAIS	TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m)
Surfactina (200 mg/L)	32,6
Surfactina (100 mg/L)	34,6
Triton X-100 (100 µL/L)	31,1
Span 20 (500 µL/L)	29,3
Niaproof (500 µL/L)	53,8

O biossurfactante B9S obtido por precipitação com sulfato de amônio devido a pouca quantidade isolada foi testado somente na concentração de 200

mg/L quanto à redução da tensão superficial. Nessa concentração a tensão superficial baixou para 55,6 mN/m.

5.4.2. Atividade emulsificante

O biossurfactante B9 apresentou uma emulsão diferente dos outros surfactantes comerciais, ou seja, produziu uma emulsão do tipo óleo em água, enquanto os demais produzem emulsões do tipo água em óleo, como pode ser verificado na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Atividade emulsificante dos surfactantes comerciais e do biossurfactante B9 em diferentes concentrações.

SURFACTANTES	EMULSÃO O/A (DO_{610nm})	EMULSÃO A/O (cm)
B9 10 ³ mg/L	1,3	-
B9 10 ² mg/L	0,5	-
B9 10 mg/L	0,2	-
B9S 10 ² mg/L	-	1,7
B9S 2 x 10 ² mg/L	-	2,3
Surfactin 10 ² mg/L	-	2,1
Triton X-100 (100 µL/L)	-	2,2
Span 20 (500 µL/L)	-	1,0
Niaproof (500 µL/L)	-	2,2

O biossurfactante B9 somente apresentou alta atividade emulsificante na concentração 1000 mg/L. Todos os surfactantes comerciais apresentaram alta atividade emulsificante com exceção de Span 20. Esse surfactante químico no entanto, apesar de não apresentar boa emulsão, consegue baixar a tensão superficial.

Mas, o biossurfactante B9S na concentração de 200 mg/L produziu uma emulsão de 2,3 cm de altura (2mL de tolueno+3,5mL de água destilada+0,7mg do biossurfactante). Essa emulsão é bastante estável apresentando as mesmas características após 3 dias, como pode ser observado na Figura 5.6.

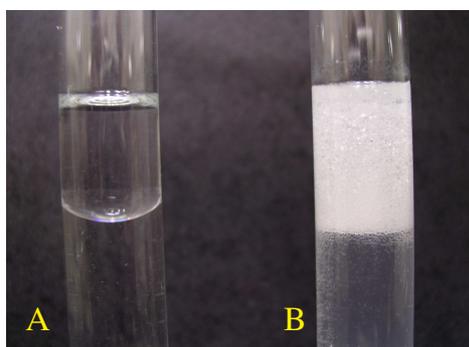


Figura 5.6. Emulsão A/O apresentado pelo biossurfactante B9S (200 mg/L) isolado por precipitação com sulfato de amônio após 3 dias – A: controle; B: amostra.

Existe uma certa dificuldade de se comparar a atividade emulsificante do tipo O/A com outros trabalhos devido as diferentes metodologias empregadas pelos autores. Lang (2002) relata em sua revisão, por exemplo, o trabalho de Kitamoto, Isoda e Nakahara (2002) que obtiveram atividade emulsificante de 1,5 de densidade óptica para monosilicritol produzida por *Pseudozyma (Candida) antarctica* quando utilizado 250 µg do bioemulsificante para 5 mL de água e 100 µL de óleo de soja a 620 nm. KIM et al. (2000) que usaram 1 mg de Emulsan em 7,5 mL de água sendo testado com 100 µL de hexadecano/ 2-metilnaftaleno (v/v), obtendo densidade óptica de 2,44 em 600 nm. Emulsan é um lipopolissacarídeo produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*, de elevado peso molecular. É reconhecido pela sua habilidade em estabilizar emulsões do tipo O/A.

5.4.3. Toxicidade

Em relação aos resultados de toxicidade, o biossurfactante B9 apresentou efeito fitotóxico na concentração 1×10^4 mg/L com 97,7% de toxicidade e na concentração 5×10^3 mg/L com 71% de toxicidade. Já a partir da concentração 1×10^3 mg/L houve maior crescimento da raiz do que na presença de água (controle) e portanto, a partir dessa concentração o biossurfactante não apresentou mais

efeito fitotóxico. Esse comportamento pode ser verificado na Figura 5.7 e demonstra que o método utilizado apresenta sensibilidade.

O uso de plantas em testes de toxicidade oferece uma série de vantagens, entre elas, baixo custo de manutenção e resultado rápido, com especial vantagem da avaliação do potencial ecotóxico dos compostos em ambientes terrestres (FARRÉ; BARCELÓ, 2003).

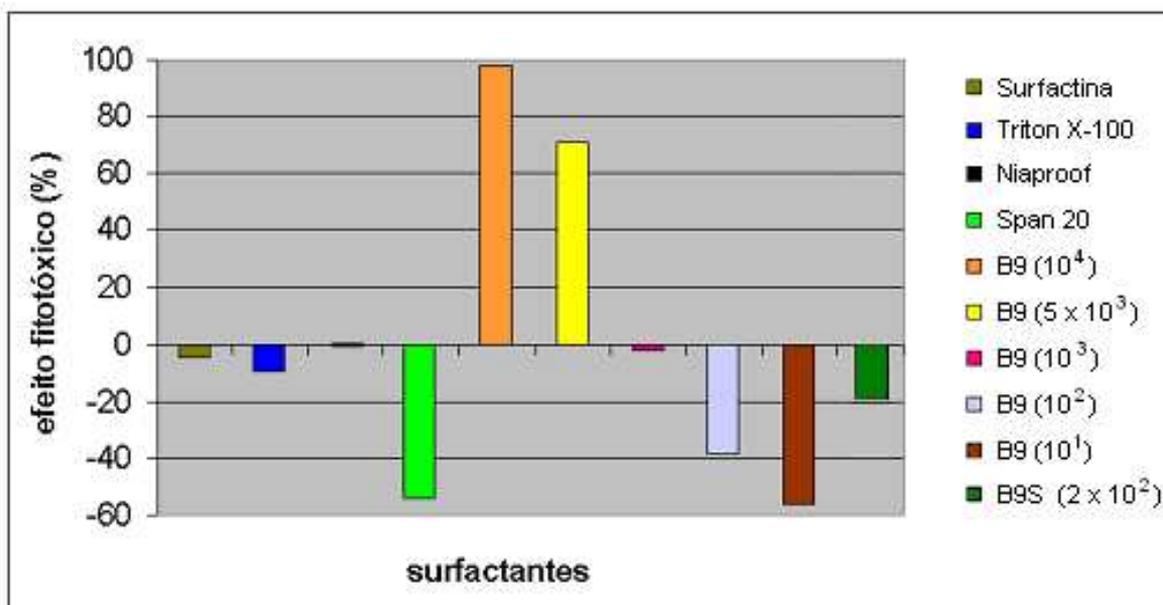


Figura 5.7. Efeito fitotóxico, em sementes de *Lactu sativa*, dos surfactantes comerciais e dos biossurfactantes B9 e B9S em diferentes concentrações.

Avaliando-se a toxicidade do biossurfactante B9S na concentração 200 mg/L observou-se que este não apresenta fitotoxicidade. Pelo contrário, apresenta um efeito de -19,1%, ou seja, houve maior crescimento da raiz do que na presença de água (controle).

Os surfactantes químicos, assim como surfactina, também não apresentaram efeito tóxico na concentração utilizada. Estes foram testados na concentração em que permitiam obter boa redução da tensão superficial.

O extrato bruto obtido após a lavagem com hexano tornou-se mais puro (0,19 g/L), considerando que houve diminuição da tensão superficial da água para

37,2 mN/m com 5×10^3 mg/L e não mais com 1×10^4 mg/L. Na Figura 5.8 pode ser observado o ponto em que há a concentração critica micelar (CMC), ou seja, o ponto em que não há mais diminuição da tensão superficial mesmo aumentando a concentração do biossurfactante.

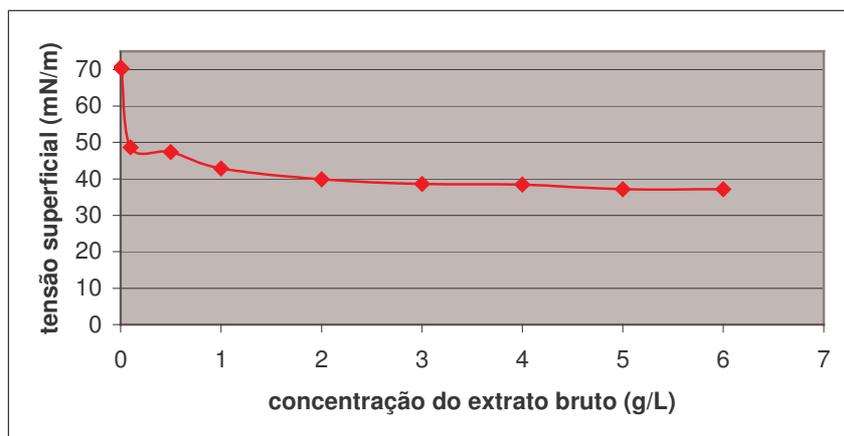


Figura 5.8. Determinação de CMC - tensão superficial versus concentração do extrato bruto do biossurfactante liofilizado.

Analisando a fitotoxicidade desse extrato na concentração de 6×10^3 mg/L e 2×10^3 mg/L, verificou-se que esta ainda é alta, sendo respectivamente 99,6% e 73,7%.

Edwards, Lepos e Lewis (2003) fizeram a comparação de três biossurfactantes, entre eles Emulsan (produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*) e três surfactantes sintéticos, entre eles Triton X-100, quanto à toxicidade em uma espécie de peixe e uma espécie de crustáceo, encontrados em estuários nos Estados Unidos. Esses surfactantes já são usados na remediação de óleo derramado. O surfactante Triton X-100 foi considerado tóxico na concentração 3,3 mg/L enquanto Emulsan apresentou toxicidade acima de 200 mg/L.

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS BIOSSURFACTANTES ISOLADOS

O biossurfactante B9 e B9S não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações estudadas, assim como o sobrenadante não apresentou atividade.

Os microrganismos testados são de importância na área alimentar, como degradadores de alimentos e/ou causadores de infecções através de veiculação alimentar ou intoxicações, com exceção de *Mycobacterium smegmatis* e *Candida albicans*. *Mycobacterium smegmatis* foi escolhido para estudo devido aos problemas que podem ser provocados pela espécie *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose. Devido a grande virulência de *M. tuberculosis* utilizou-se a outra espécie. Já, a levedura *Candida albicans* foi escolhida pelo seu histórico patogênico.

Lang, Katsiwela e Wagner (1989) estudaram a atividade antimicrobiana de soforolípido produzido por *Torulopsis bombicola*, do ramnolípido produzido *Pseudomonas* sp., do trealoselípido produzido por *Rhodococcus erythropolis* e do celobioselípido produzido por *Ustilago maydis*, tendo como microrganismos-teste *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans*, entre outros. Esses dois microrganismos não sofreram qualquer efeito de inibição quando em contato com os biossurfactantes acima citados, assim como aconteceu em nosso trabalho, com o biossurfactante B9 e B9S. As bactérias Gram-positivas são consideradas mais sensíveis aos biossurfactantes do que as bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*. Kitamoto, Isoda e Nakahara (2002) citam em seu trabalho a atividade antimicrobiana de manosileritrolípido produzido por *Candida antarctica*, soforolípido produzido por *Candida apicola* e ramnolípido produzido por *P. aeruginosa* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Todos os biossurfactantes citados apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos utilizados numa concentração que variou entre 7,8 mg/L a 800 mg/L. Somente o soforolípido não apresentou

atividade contra *C. albicans*. O fungo filamentoso *Aspergillus niger*, foi inibido pelo ramnolípídeo na concentração de 16 mg/L e pelo manosileritritolípídeo numa concentração acima de 400 mg/L. Mas, o soforolípídeo não causou qualquer inibição.

5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES

Foi realizada a caracterização do biossurfactante extraído com clorofórmio:metanol (B9) e o isolado através da precipitação com sulfato de amônio (B9S).

Observou-se que os dois biossurfactantes apresentaram duas bandas que foram reveladas com rodamina 6G. O biossurfactante B9 apresentou bandas com Rf 0,44 e 0,62 enquanto B9S apresentou bandas com Rf 0,52 e 0,63.

Kushida (2000) estudou a produção de biossurfactante por *Planococcus citreus* em óleo de oliva. Quando analisou por cromatografia em camada delgada, o extrato bruto extraído com clorofórmio:metanol apresentou Rf 0,44 e 0,65.

Os resultados descritos acima mostram que a banda com Rf em torno de 0,6 é a banda que sempre está presente, não importando o tipo de substrato utilizado para crescimento, ou seja, óleo diesel ou óleo de oliva ou o método de isolamento empregado. Essa banda foi isolada e analisada quanto à tensão superficial, sendo confirmado que a mesma baixa a tensão superficial da água para 37 mN/m. Após isso, a mesma foi analisada por espectrometria de massas.

A amostra purificada do biossurfactante foi identificada através do ESI(+)-MS como uma mistura de 10 oligômeros. Os oligômeros mostram uma diferença de 44 u (de m/z 502 a m/z 899, Figura 5.9). As moléculas tem ao menos 6 unidades de 44 u ligadas $[-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-]_n$. Massas ímpares de $[\text{MH}]^+$ indicam que há 1N (C=O de amida porque há a perda 17=NH₃). No experimento de MS/MS (CID) há sempre a formação de um íon de m/z 291 que é ímpar, sugerindo a presença de (C, H,O), cuja estrutura estaria de acordo com $[(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_5-$

$\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_2 + \text{H}^+$. Verificou-se também a perda de um fragmento neutro de m/z 126 (C_9H_{14}).

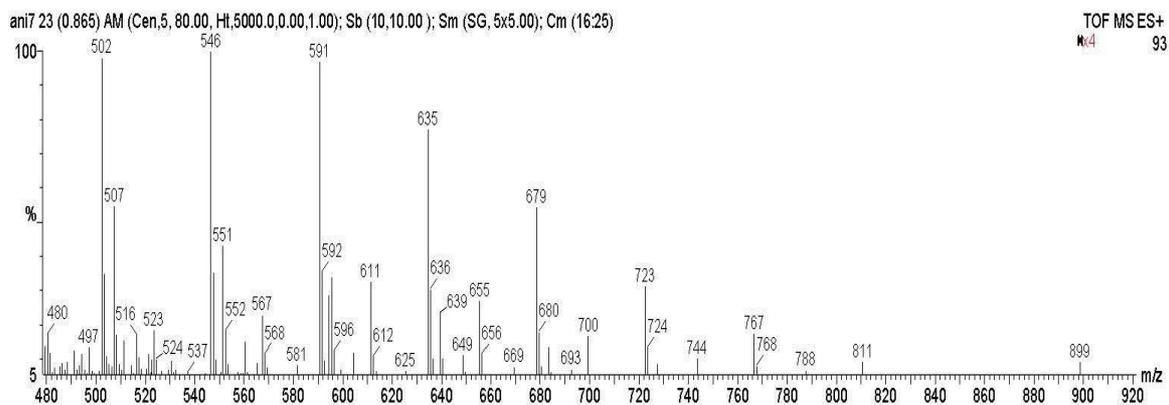


Figura 5.9. Espectro de Massas do biossurfactante B9 com Rf 0,6 produzido por *P. citreus*.

Análise de FT-IR (Figura 5.10) mostrou a presença de estiramento em 3403 cm^{-1} , que pode ser de OH. Os estiramentos em 2961 , 2919 e 2850 cm^{-1} sugerem a presença de CH. Não há banda de carbonos aromáticos ($1530\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$). As bandas em 1709 e 1639 cm^{-1} sugerem a presença de C=O de cetona, e em 1639 cm^{-1} a da amida.

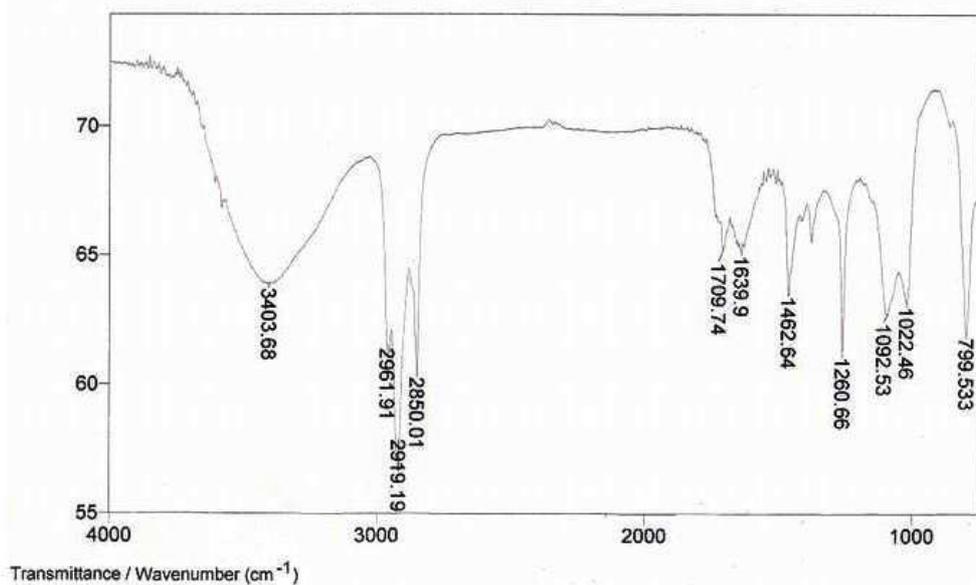


Figura 5.10. Espectro de Infravermelho da banda com Rf 0,6 do biossurfactante B9 produzido por *P. citreus*.

A fração com Rf 0,6 apresenta o espectro de Infravermelho bastante semelhante com o lipopeptídeo de *Bacillus licheniformes* (Figura 5.11) e do glicolípido (soforolípido) de *Torulopsis bombicola* (Figura 5.12).

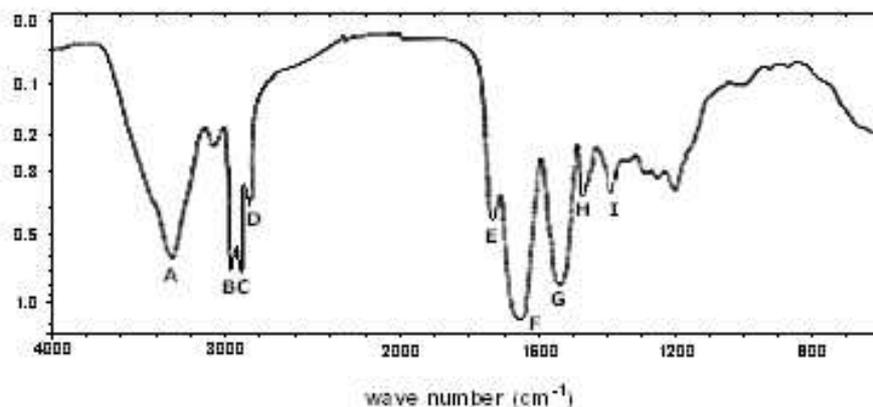


Figura 5.11. Espectro de Infravermelho do biossurfactante (lipopeptídeo) de *Bacillus licheniformes* JF-2 (JENNY et al., 1991)

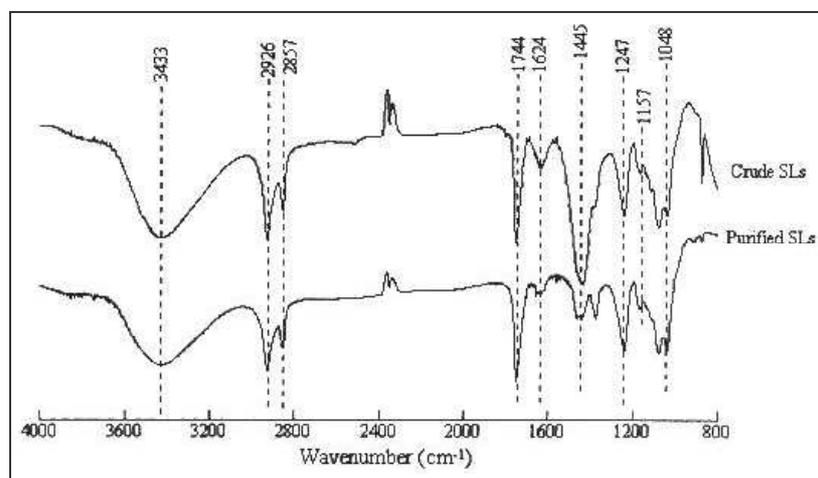


Figura 5.12. Espectro de Infravermelho de soforolípido (glicolípido) antes e depois da purificação (HU e JU, 2001)

Pode-se observar no espectro do lipopeptídeo que há um estiramento intenso característico de ligação peptídica em 1530 cm^{-1} e várias ligações CONH em 3430 cm^{-1} pelo aspecto agudo da banda, além de uma cadeia de hidrocarbonetos em $3000\text{ a }2800\text{ cm}^{-1}$. Já no espectro do glicolípido há uma

banda larga em 3430 cm^{-1} correspondendo a OH. Há estiramento também na região de 3000 e 2800 cm^{-1} como no lipopetídeo. Comparando esses espectros de Infravermelho com o espectro do biossurfactante de *P. citreus* observa-se várias bandas em regiões semelhantes, como na região de 3400 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 2800 cm^{-1} além da região de 1700 a 1000 cm^{-1} . No entanto, como já discutido acima há as particularidades que levam a inferir que o biossurfactante de *P. citreus* analisado não é nem lipopetídeo e nem glicolípido.

Através da análise de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) foi obtido um espectro (Figura 5.13) onde se pode verificar que não há a presença de H aromáticos (δ 7-8). Há a presença de =CH (δ 5,39) e de -CH saturado (δ 0,4 -2,5). Em δ 8,6 existe um pequeno sinal que sugere a presença de amida.

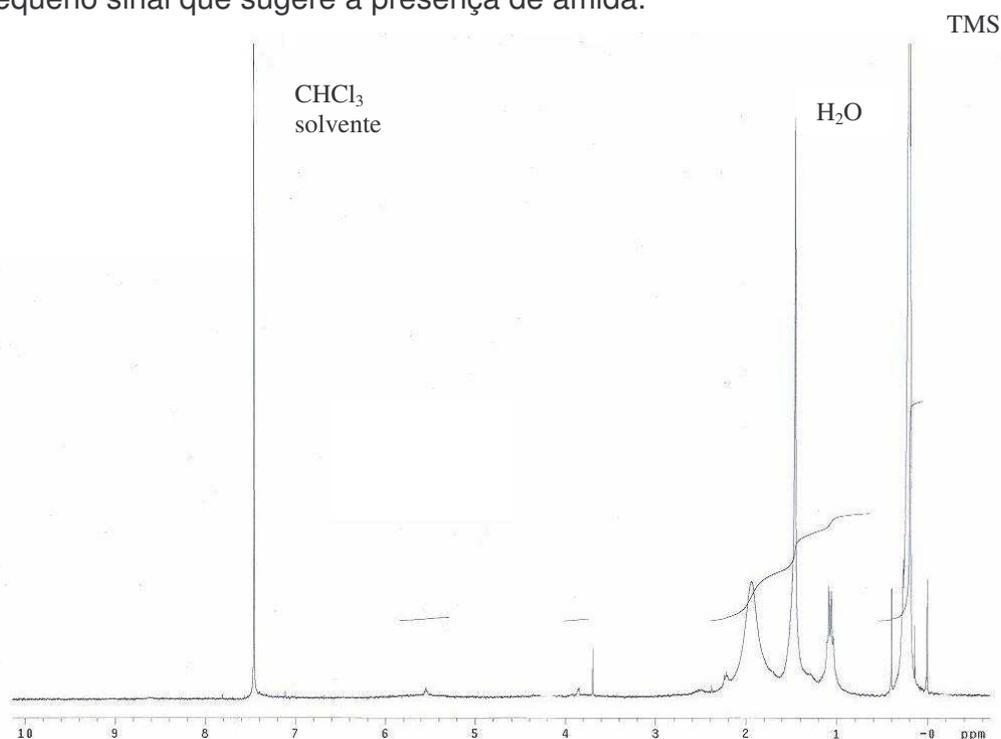
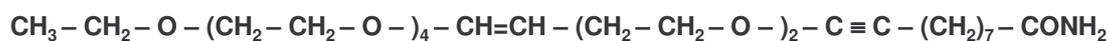


Figura 5.13. Espectro de ^1H -RMN do biossurfactante B9 com Rf 0,6. O solvente usado foi CDCl_3 , 300 MHz.

Então, uma possível estrutura do m/z 502 pode ser a seguinte:



A banda com Rf 0,44 do B9 e as bandas do B9S também foram caracterizadas. Foi obtido pouco material isolado correspondente a banda com Rf 0,44. Nas análises realizadas verificou-se que esse não baixou a tensão superficial da água como a banda com Rf 0,6, mas apresentou melhor emulsão do tipo O/A do que observada quando se isolou a banda com Rf 0,6. Isso sugere que *P. citreus* produz frações com características tensoativas ou emulsificantes. A fração com maior capacidade de redução de tensão superficial é a banda com Rf 0,6. Já, a fração que forma uma emulsão do tipo O/A que deveria ser teoricamente mais hidrofílica do que a fração que forma uma emulsão do tipo A/O, teve essa característica confirmada quando se consideram os Rf's das frações da extração com clorofórmio:metanol (Rf 0,44) e do isolamento com sulfato de amônio (Rf 0,52), mostrando que esse último é mais lipofílico já que apresenta Rf maior.

Fazendo a análise dessas frações através de ESI (+)-MS observa-se o mesmo padrão já obtido para a banda com Rf 0,6. A figura 5.14 mostra o espectro de massas para a banda com Rf 0,52. Pode-se observar novamente uma mistura de 10 oligômeros que mostram uma diferença de 44 u. No entanto, o pico de m/z 502 é menor do que apresentado na banda com Rf 0,6.

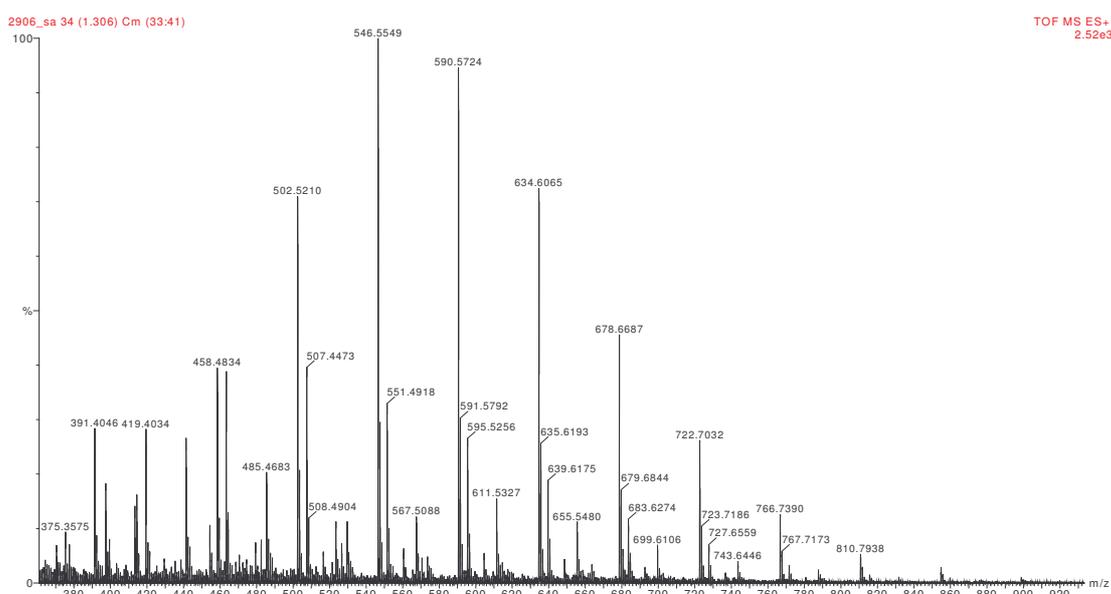


Figura 5.14. Espectro de massa do biossurfactante B9S com Rf 0,52 produzido por *P. citreus*.

Através da análise de RMN-¹H foi obtido um espectro (Figura 5.15) apresentando as mesmas características obtidas no espectro da banda com Rf 0,6.

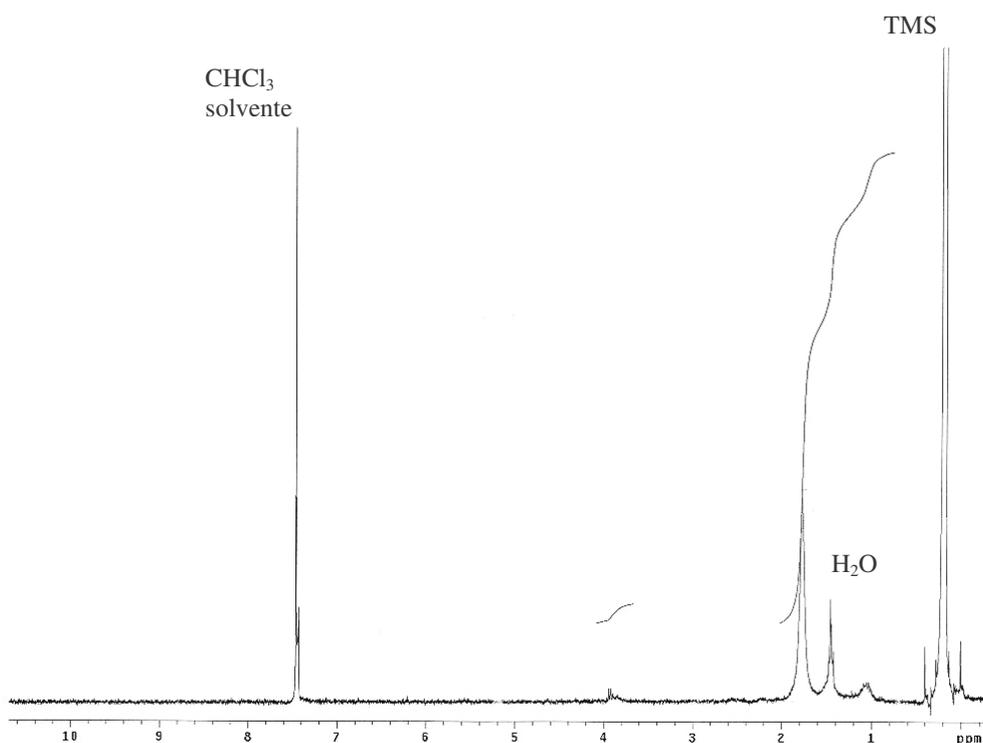


Figura 5.15. Espectro de ¹H-RMN do biossurfactante B9S com Rf 0,52. O solvente usado foi CDCl₃, 300 MHz.

Através dos resultados obtidos com as análises de Espectrometria de Massas, Infravermelho e RMN, verifica-se que *P. citreus* produz uma mistura de oligômeros de peso molecular baixo e que apresentam uma região polar e outra apolar, característico de biossurfactantes.

Novas classes de biossurfactantes vem sendo descritas, como, por exemplo, os flavolípidos, produzidos por *Flavobacterium* sp. Esta bactéria produz uma mistura de pelo menos 37 flavolípidos que apresentam peso molecular entre 584 a 686 (BODOUR et al, 2004).

Maier (2003) cita que há poucas estruturas de biossurfactantes completamente elucidadas. A razão, segundo a autora, é que o processo requerido é tedioso e difícil, e que as etapas de purificação e elucidação da estrutura dependem do conhecimento de profissionais da área de química. Além disso, poucos laboratórios de microbiologia são bem equipados para tal.

5.7. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DO BIOSURFACTANTE

O extrato bruto (B9) foi avaliado durante 1 ano, em intervalos de 4 meses. Essa avaliação não foi feita para o extrato obtido por precipitação com sulfato de amônio por este ter sido isolado posteriormente.

Pode-se observar na Tabela 5.7 que o biossurfactante na concentração 10^4 mg/L manteve a redução da tensão superficial durante o tempo avaliado. A atividade emulsificante O/A não pôde ser exatamente quantificada nessa concentração, pela alta densidade óptica apresentada, superior ao poder de leitura do equipamento.

Tabela 5.7. Avaliação do extrato bruto (B9) durante 12 meses, quanto à redução da tensão superficial e atividade emulsificante.

CONCENTRAÇÃO (mg/L)	0 MESES		4 MESES		8 MESES		12 MESES	
	TS*	ABS	TS	ABS	TS	ABS	TS	ABS
10^4	38	>2	37,8	>2	37,3	>2	37,5	>2
10^3	50,7	1,3	50,4	1,4	47,4	1,5	47,2	1,2
10^2	62,4	0,5	66,0	0,6	61,8	0,5	64,1	0,5

* tensão superficial em mN/m

Para a concentração 10^3 mg/L a tensão superficial ficou entre 50,7 e 47,2 mN/m. A capacidade de atividade emulsificante não foi perdida apresentando

ainda aos 12 meses atividade de 1,2. Essa mesma estabilidade foi observada na concentração 10^2 mg/L.

A toxicidade também foi acompanhada nos períodos citados e verificou-se que na concentração 10^4 mg/L, onde há a melhor redução da tensão superficial a fitotoxicidade permaneceu alta e inalterada.

5.8. AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Planococcus citreus*

A avaliação de outros meios de cultura foi realizada com o objetivo de verificar maior produção de biosurfactante por *P. citreus*. Foi testado também como substrato hidrofóbico o óleo residual de fritura, um substrato sem custo, já que esse óleo depois do seu uso não tem praticamente nenhum aproveitamento.

Anteriormente a esse experimento, haviam sido feitas várias tentativas de otimização do meio de cultura utilizando a metodologia de planejamento experimental, mas não foram obtidos resultados satisfatórios. Isto pode ter ocorrido por ter sido usado óleo diesel como substrato oleoso e como este é uma mistura complexa de compostos (alcanos normais, ramificados e cíclicos, compostos aromáticos, alcenos, entre outros), há uma grande variação no período da produção do biosurfactante, ou seja, dependendo da composição do meio a bactéria utiliza primeiramente um composto e quando este se esgota utiliza o outro. Portanto, como nesse experimento era determinado um período de coleta fixo, talvez o pico de maior produção não era observado.

Dessa forma, para esse estudo, foram empregados meios de cultura com diferentes formulações utilizados na produção de vários biosurfactantes. Entre os meios testados o mais complexo é o Meio Robert, enquanto o Meio Kim tem praticamente a mesma composição do meio líquido empregado durante todo o trabalho (Meio base), mas os compostos em quantidades bem inferiores. Os

meios de cultura aqui empregados receberam como denominação o nome do primeiro autor do artigo. As referências foram citadas no item 4.8.

Segundo Mulligan e Gibbs (1993) a fonte de nitrogênio é a mais importante na produção de biossurfactantes após a fonte de carbono. Dependendo do microrganismo maior produção de biossurfactante pode ocorrer na presença de uma fonte de nitrogênio orgânica ou inorgânica. O Meio Cooper se diferencia dos demais meios por apresentar uma fonte de nitrogênio orgânica na sua composição, ou seja, apresenta uréia, enquanto que o Meio Robert e o Meio Kim apresentam um sal inorgânico, no caso, nitrato de sódio. Já o meio base apresenta duas fontes de nitrogênio, orgânica (peptona) e inorgânica (nitrato de sódio).

Em comum todos esses meios apresentam na sua composição, KH_2PO_4 e MgSO_4 , como fosfato e sulfato que são geralmente requeridos em maiores concentrações. Fosfatos orgânicos têm função no metabolismo intermediário, especialmente como constituintes de adenosina trifosfato, adenosina difosfato e arginina fosfato. Fosfato é também constituinte de fosfolipídios e ácidos nucleicos e um regulador de certas enzimas do metabolismo primário e secundário. Sulfato é requerido para a biossíntese de aminoácidos e certos metabólitos secundários. O extrato de levedura também está presente em todos os meios estudados. Somente no Meio Robert, além do extrato de levedura ainda há uma solução traço de micronutrientes inorgânicos como potássio, magnésio, cálcio, etc., que são cofatores ou ativadores para vários sistemas enzimáticos e como reguladores de vários metabólitos secundários (GREASHAM; HERBER, 1997; COTE; GHERNA, 1994).

Cada meio de cultura apresenta uma determinada tensão superficial em função de sua composição. Para facilitar a análise dos dados, a redução da tensão superficial obtida em cada meio foi apresentada em unidades. Os valores reais com o desvio padrão são apresentados nos apêndices.

O Meio Cooper foi avaliado com diferentes concentrações de glicose já que este foi o único meio testado que apresenta na sua composição original este composto.

Observa-se tanto na Figura 5.16 quanto na Figura 5.17 que o meio Cooper com 0,1% de glicose é o meio mais eficiente, propiciando maior redução de tensão superficial e maior atividade emulsificante, respectivamente.

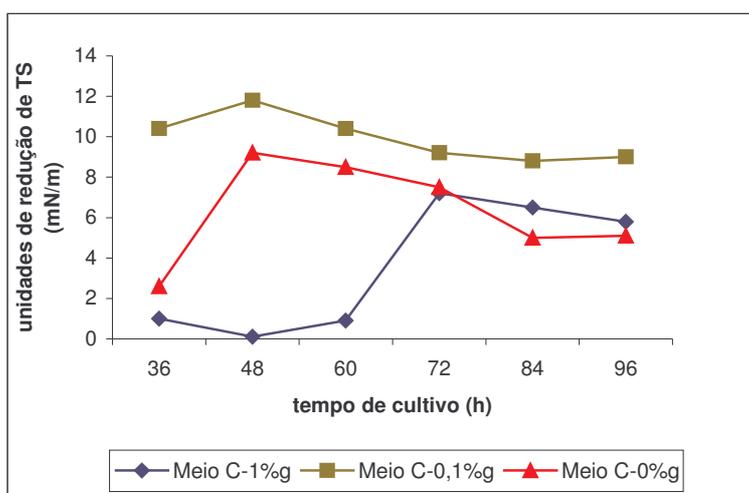


Figura 5.16. Redução da tensão superficial obtida durante 96h em meio Cooper com diferentes concentrações de glicose e com 10% de óleo diesel.

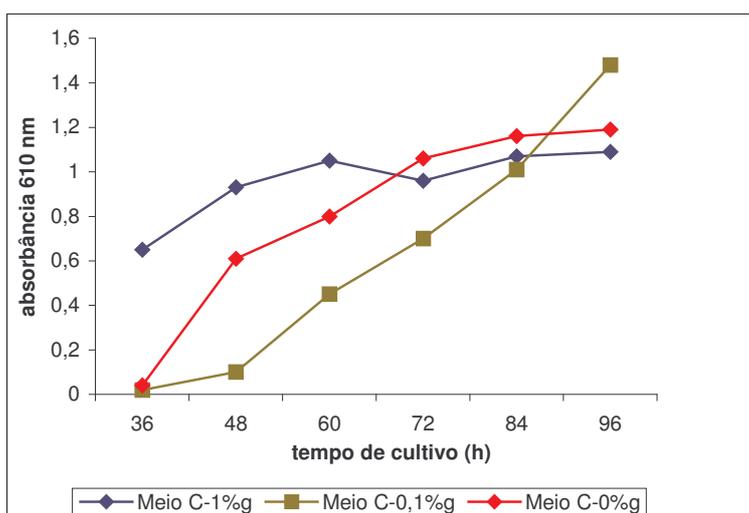


Figura 5.17. Atividade emulsificante do tipo O/A obtida durante 96h em meio Cooper com diferentes concentrações de glicose e com 10% de óleo diesel.

Em virtude do meio Cooper apresentar bom resultado, o mesmo foi testado com outro substrato oleoso (Figura 5.18). Foi utilizado 1 e 10% de óleo residual de fritura (OF). Este resíduo é composto de óleo de soja, gordura de frango e peixe e restos de farinha de rosca, utilizado para empanar. Além desse novo substrato, testou-se também o óleo diesel a 1%.

Os resultados com óleo diesel foram inferiores na concentração de 1% do que a 10% em termos de redução de tensão superficial e atividade emulsificante. Mas, obteve-se melhor resultado em termos de redução de tensão superficial utilizando apenas 1% do óleo de fritura, a partir de 72h de cultivo (Figura 5.19 e 5.20).

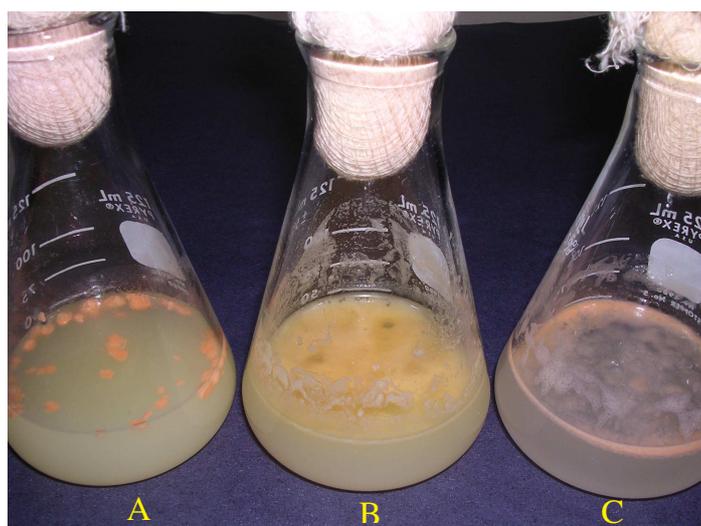


Figura 5.18. *P. citreus* crescido por 48 h em meio Cooper (0,1% de glicose) utilizando 1% de óleo residual de fritura (A), 10% de óleo residual de fritura (B) e 1% de óleo diesel (C).

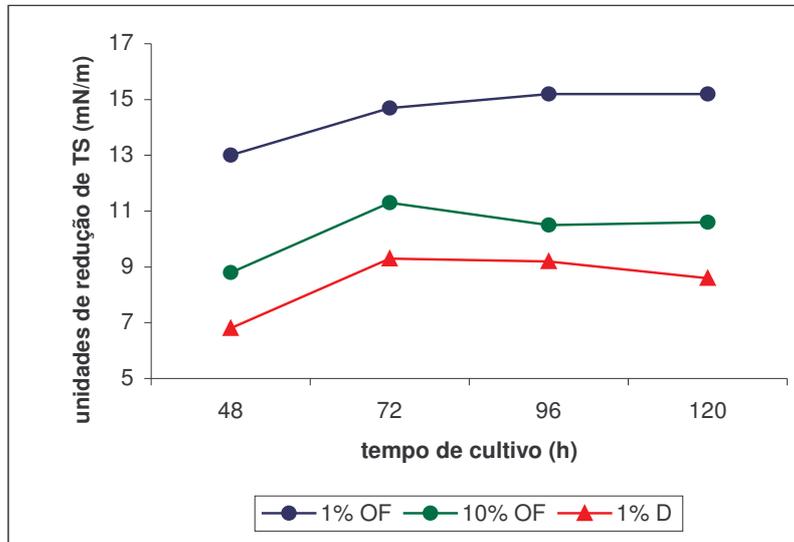


Figura 5.19. Avaliação do meio Cooper com 0,1% de glicose, usando como substrato oleoso 1 e 10% de óleo residual de fritura e 1% de óleo diesel.

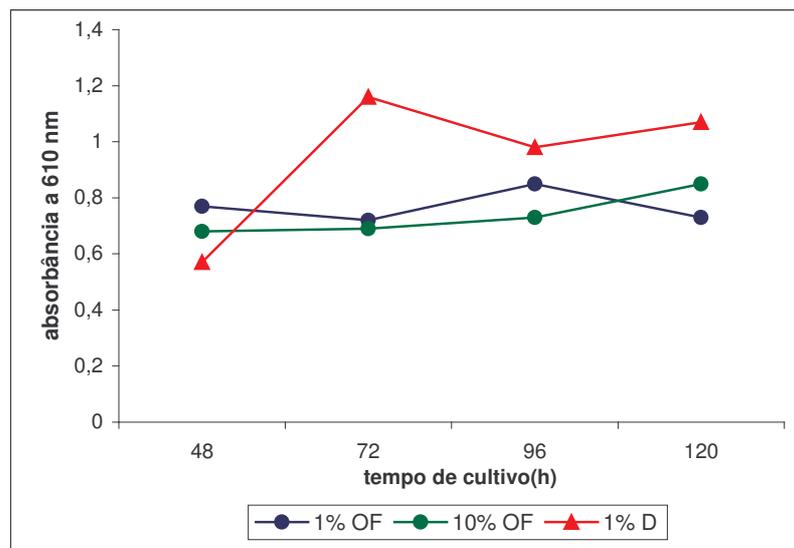


Figura 5.20. Atividade emulsificante do tipo O/A no meio Cooper com 0,1% de glicose, usando como substrato oleoso 1 e 10% de óleo residual de fritura e 1% de óleo diesel.

Foram realizados estudos em meio Robert e meio Kim contendo 1% de óleo residual de fritura já que este se mostrou promissor, como pôde ser observado pelos resultados apresentados anteriormente.

No meio Kim foi obtida a maior redução da tensão superficial (Figura 5.21), atingindo 16,5 unidades. No meio Robert atingiu-se somente 10,7 unidades com o mesmo substrato oleoso, apesar deste apresentar na sua composição FeSO_4 e traços de sais. De acordo com Mulligan e Gibbs (1993), em geral a presença de metais não têm um efeito significativo na produção de biossurfactantes, no entanto, algumas bactérias, como, por exemplo, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, têm a produção do biossurfactante aumentado pela adição de FeSO_4 . Pelos resultados obtidos verifica-se que *P. citreus* não é afetado significativamente por estes compostos, visto que resultados com maior redução de tensão superficial foram obtidos na ausência destes.

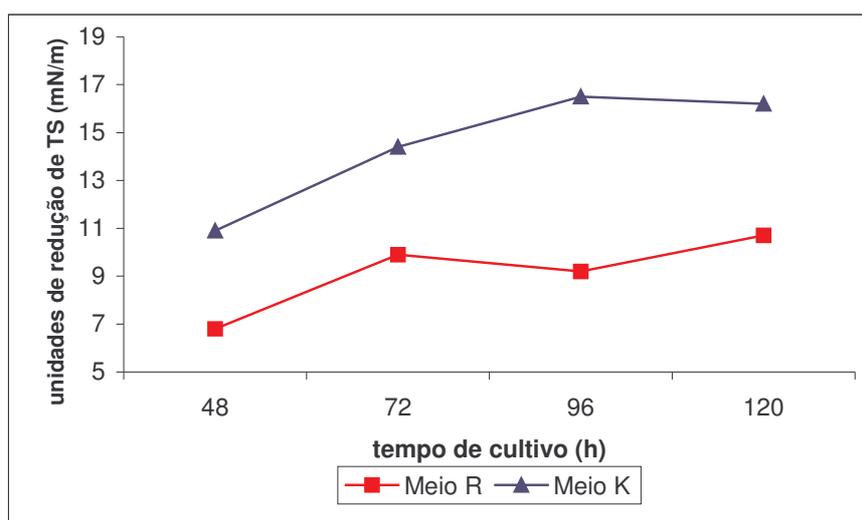


Figura 5.21. Redução da tensão superficial obtido com *P. citreus* crescido durante 120h em meio Robert e meio Kim com 1% de óleo residual de fritura.

Em termos de formação de emulsão (Figura 5.22) o meio Kim também foi o melhor, chegando a produzir uma emulsão com mais de 1,2 de densidade óptica.

Este resultado é bastante interessante já que o Meio Kim é muito similar ao meio base, mas com a concentração dos compostos inferior.

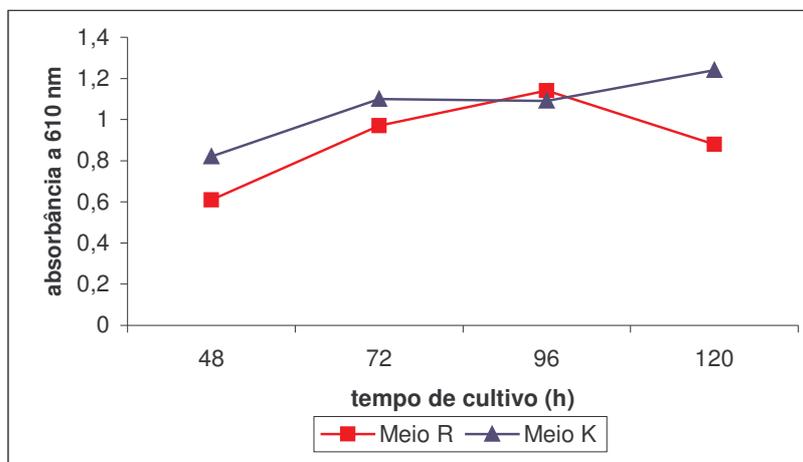


Figura 5.22. Atividade emulsificante obtida com *P. citreus* crescido durante 120h em meio Robert e meio Kim com 1% de óleo residual de fritura.

Os meios Robert e Kim também foram testados com 10 e 1% de óleo diesel, mas não apresentaram melhores resultados de redução de tensão superficial quando utilizado óleo residual de fritura (dados não mostrados).

Fazendo uma análise geral dos dados obtidos nesse experimento, verifica-se que a maior emulsão O/A foi alcançada quando o óleo diesel foi utilizado. No entanto, a maior redução de tensão superficial foi obtida com o óleo residual de fritura. Mas este resíduo parece ser de mais difícil acesso para bactéria, visto que os melhores resultados foram obtidos geralmente a partir de 96h. No meio Cooper, quando foi utilizado óleo diesel, a maior redução da tensão superficial ocorreu em 48h, mas utilizando-se óleo residual de fritura esse período passou para 72h.

Pode-se observar ainda que a atividade emulsificante nem sempre acompanhou o mesmo desempenho apresentado na redução da tensão superficial. No meio Cooper, onde foi utilizado 10% de óleo diesel, observamos claramente um aumento gradual da atividade emulsificante chegando a atividade ótima em 96 h, mas a redução da tensão superficial é maior com 48h de crescimento. Isso mostra que há diferentes frações de biossurfactante produzidas por *P. citreus* e que dependendo da composição do meio de cultura e do substrato

oleoso, uma fração pode ser produzida em maior quantidade do que a outra e em diferentes tempos.

Haba et al. (2000) testaram 36 microrganismos, entre bactérias e leveduras, quanto à produção de biosurfactantes em resíduos de óleo de oliva e girassol usados em fritura (2%). O meio de cultura apresentou tensão superficial 57 mN/m e um microrganismo foi considerado bom produtor de biosurfactante quando baixou a tensão superficial para 40 mN/m. Em nosso estudo obtivemos resultado semelhante, já que o meio de cultura apresentou tensão superficial 54,2 mN/m e foi reduzido para 37,7 mN/m.

Verificamos, então, que é possível reutilizar um resíduo como substrato para a produção de biosurfactante por *P. citreus*, sendo este um dos primeiros passos para diminuir os custos da produção.

6. CONCLUSÕES

↪ Entre os fungos estudados da Região Amazônica, as leveduras mostraram maior produção de bioemulsificantes em comparação aos fungos filamentosos testados;

↪ *P. citreus* foi o mais eficiente na produção de biossurfactantes entre todos os microrganismos testados;

↪ O pH 7 foi o melhor para produção de biossurfactantes por *P. citreus*;

↪ *P. citreus* produziu dois tipos de biossurfactantes, um com atividade emulsificante do tipo O/A (B9) e outro do tipo A/O (B9S);

↪ A produção do biossurfactante B9 de *P. citreus* foi maior em fermentador;

↪ O biossurfactante B9 quando apresentou a maior eficiência na redução da tensão superficial da água apresentou efeito fitotóxico;

↪ O biossurfactante B9S apresentou excelente atividade emulsificante em baixa concentração e não apresentou fitotoxicidade;

↪ O biossurfactante B9 em seu estado bruto, ainda não é competitivo com os surfactantes químicos e biossurfactante comercial;

↪ Nenhum dos biossurfactantes isolados apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos-teste utilizados;

↪ Os biossurfactantes de *P. citreus* são uma mistura de oligômeros de baixo peso molecular;

↪ O biossurfactante B9 foi estável durante 12 meses quanto à redução da tensão superficial, atividade emulsificante e fitotoxicidade;

↪ O óleo residual de fritura mostrou-se promissor para produção de biossurfactante por *P. citreus*.

7. BIBLIOGRAFIA

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**. v. 17, p.1367-1371, 2001.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and Iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, p. 749-754, 2000.

BACH, H. BERDICHEVSKY Y. & GUTNICK, D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier Emulsan. **Applied and Environmental Microbiology**. 69(5): 2608-2615, 2003.

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

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

BARRIGA, J.A.T.; COOPER, D.G.; IDZIAK, E.S.; CAMERON, D.R. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.25, p. 96-102, 1999.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 45, p. 493-496, 1966.

BIOSURFACTANT scale-up. **Chemical Week**, 163(45): 27, 2001.

BRANDA, S. S.; GONZALEZ-PASTOR, J. E.; BEN-YEHUDA, S.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proceedings of National Academy of Science of USA**. v. 98, p. 11621-11626, 2001.

BODOUR, A. A.; GUERRERO-BARAJAS, C.; JIORLE, B. V.; MALCOMSON, M. E.; PAULL, A. K.; SOMOGYI, A.; TRINH, L. N.; BATES, R. B.; MAIER, R. M. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 1, p. 114-120, 2004.

BODOUR, A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 6, p. 3280-3287, 2003.

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

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

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

CARVALHO, D.F.; MARCHI, D.D. ; DURRANT, L. R. Production of extracellular surface-active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. **In Situ and**

On-Site bioremediation – Microbial considerations. Batelle Press, v. 4, p. 91-96, 1997.

CLAUS, D.; FRITZE, D.; KOCUR, M. Genera related to the genus *Bacillus* – *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Planococcus*, *Filibacter*, and *Caryophanon*. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The Prokaryotes.** Springer-Verlag. v. 2, 1992, p.1770-1791.

COELHO, R. S.; JACKISCH-MATSUURA, A. B.; DURRANT, L. R. Evaluation of four isolation methods for biosurfactants produced by *Planococcus citreus*, *Pantoea agglomerans* and *Bacillus mycoides*. **Proceedings of the Fifth Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium.** 2004.

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology.**v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.

COOPER, D. V.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

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

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

COTE, R. J.; GHERNA, R. Nutrition and Media. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N.R. **Methods for general and molecular bacteriology**. American Society for Microbiology. p.155-177, 1994.

CRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**. v. 93, p. 915-929, 2002.

DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; TOOLE, G. A. O. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**. v. 185, p. 1027-1036, 2003.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**. v. 7, p. 641-646, 2004.

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

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

DOS REIS - GORNY. M. F.; DURRANT, L. R. Screening Fungi for Their Possible Ability to Degrade Dioxins and Furans. In: **In Situ and On- Site Bioremediation, 2003** [electronic resource]: proceedings of the Seventh International In Situ and On- Site Bioremediation Symposium June 2-5, 2003, Orlando, Florida. Eds. Magar, V. S. and Mark, E. K. ISBN 1-57477-139-6. 2003

DUTKA, B.J. **Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters and Sediments**. National Water Research Institute, Environment Canada: Burlington, Ontario, Canada, 1989.

EDWARDS, K. R.; LEPO, J. E.; LEWIS, M. A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, article in press, 2003.

ENGELHARDT, M. A.; DALY, K.; SWANNELL, R. P. J.; HEAD, I. M. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, n. 237-247, 2001.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 22, n. 5, p. 299-309, 2003.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Food Science and Technology**. 31:283-293, 1992.

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

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

GREASHAM, R. L.; HERBER, W.K. Design and optimization of growth media. IN: RHODES, P. M.; STANBURY, P. F. **Applied Microbial Physiology – A Practical Approach**. IRL Press, p.51 – 74, 1997.

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

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

HU, Y.; JU, L. K. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. **Journal of Biotechnology**. v 87, p. 263-272, 2001.

IVSHINA, I. B.; KUYUKINA, M. S.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.14, p. 711-717, 1998.

JACOBUCCI, D. F. C. **Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos**. 2000. 117p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – UNICAMP, Campinas, 2000.

JENNY, K., KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformes*: structural analysis characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 36, p. 5-13, 1991.

JONHSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V.S.; DILIP, K. A.; SISTA, V. ; YADAV, N. Bioemulsifier production by oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**. v. 14 , n. 6, p. 487-490, 1992.

KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.33, n.6, p.973-976, 1969.

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

KITAMOTO, D.; ISODA, H. ; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. **Biosurfactants and biotechnology**. Marcel Dekker, 1987, 342 p.

KUSHIDA, M. M. **Caracterização parcial e propriedades de biossurfactantes microbianos**. 2000. 78 p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – UNICAMP, Campinas, 2000.

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

LANG, S.; KATSIWELA, E.; WAGNER, F. Antimicrobial effects of biosurfactants. **Fat Science Technology**. v. 91, n. 9, p. 363-366, 1989.

LIN, S.C. Biosurfactans: Recent advances – review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. vol. 66, p. 109-120, 1996.

MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**. v. 52, p. 101-121, 2003.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: Biosynthesis and potential environmental applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 54, p. 625-633, 2000.

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**. v. 58, p. 428-434, 2002.

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

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: KOSARIC, N. **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. p. 329-369.

MURIEL, J.M., BRUQUE, J.M, OLIAS, J.M e JIMENEZ-SANCHEZ, A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, 18 (3):235-240, 1996.

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

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUNGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**. v. 92, p. 287-294, 2002.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Short Communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 13, p. 133-135, 1997.

RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeast, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 14, p. 938-943, 1992.

RICHTER, M.; WILLEY, J. M.; SUSSMUTH, R.; JUNG, G.; FIEDLER, H. P. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tu 901/8c. **FEMS Microbiology Letters**. v. 163, p.165-171, 1998.

ROBERT, M.; MERCADE, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**. v. 11, n. 12, p. 871-872, 1989.

ROCHA, C. ; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. ; VIERMA, L. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 8, p. 125-128,1992.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 249-252, 2002.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**. v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

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

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

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

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**. v. 22, n. 3, p. 142-145, 2004.

TILLOTSON, R. D.; WOSTEN, H.A.B., RICHTER, M.; WILLEY, J.M. A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophillum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. **Molecular Microbiology**. v. 30, n. 3, p. 595-602, 1998.

VEGT, W.; MEI, H. C.; WOSTEN; WESSELS, J.G.H.; BUSSCHER, H.J. A comparison of the surface activity of the fungal hydrophobin SC3p with those of other proteins. **Biophysical Chemistry**. v. 57, p.253-260, 1996.

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

WHITEFORD, J.R.;SPANU, P. D. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. **Molecular Plant Pathology**. v. 3, n. 5, p. 391-400, 2002.

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

WOSTEN, H. A. B.; WETTER, M. ; LUGONES, L. G.; MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J.; WESSELS, J. G. H. How a fungus escapes the water to grow into the air. **Current Biology**. v.9, n.2, p. 85-88, 1999.

8. APÊNDICE

8.1 – Tensão superficial (mN/m) apresentado pelo ensaio com Meio Cooper com 1% de glicose (A), com 0,1% de glicose (B) e 0% de glicose (C) e 10% de óleo diesel, em triplicata, a sua média e desvio padrão.

A

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
36	46,2	47,2	53,1	48,8	3,7
48	48,9	48,8	51,4	49,7	1,5
60	52,1	51,4	43,1	48,9	5,0
72	38,7	44,6	46,4	43,2	4,0
84	42,7	43,2	44,1	43,3	0,7
96	43,2	43,9	44,9	44	0,8
CT	50	50,9	48,4	49,8	1,3

B

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
36	40,1	39,7	41	40,3	0,7
48	37,3	39,7	39,8	38,9	1,4
60	40,5	39,7	40,8	40,3	0,6
72	41,8	42,1	40,5	41,5	0,8
84	41,2	39,7	44,8	41,9	2,6
96	41,5	40,8	42,9	41,7	1,1
CT	53,1	49	49,9	50,7	2,2

C

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
36	50,9	47,7	50,5	49,7	1,7
48	39,8	42,9	46,5	43,1	3,4
60	44,6	45,5	41,2	43,8	2,3
72	45,3	44,9	44,2	44,8	0,6
84	47,5	47,7	46,8	47,3	0,5
96	46,8	47,9	46,9	47,2	0,6
CT	50,4	54,7	51,9	52,3	2,2

8.2 – Atividade emulsificante do tipo O/A (densidade óptica a 610 nm) apresentado pelo ensaio com Meio Cooper com 1% de glicose (A), com 0,1% de glicose (B) e 0% de glicose (C) e 10% de óleo diesel, em triplicata, a sua média e desvio padrão.

A

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
36	0,87	0,84	0,72	0,81	0,08
48	1,08	1,02	1,18	1,09	0,08
60	1,17	1,15	1,31	1,21	0,08
72	1,21	1,03	1,11	1,12	0,09
84	1,16	1,16	1,36	1,23	0,12
96	1,31	1,18	1,26	1,25	0,06
CT	0,19	0,13	0,15	0,15	0,03

B

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
36	0,17	0,25	0,18	0,2	0,04
48	0,35	0,33	0,16	0,28	0,10
60	0,23	0,3	1,35	0,63	0,63
72	0,66	1,36	0,62	0,88	0,42
84	1,23	1,2	1,14	1,19	0,04
96	1,87	1,78	1,32	1,65	0,29
CT	0,22	0,19	0,12	0,18	0,05

C

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
36	0,24	0,36	0,18	0,26	0,09
48	0,95	1,11	0,44	0,83	0,35
60	0,54	1,25	1,26	1,01	0,41
72	1,4	1,32	1,11	1,28	0,15
84	1,4	1,35	1,39	1,38	0,03
96	1,14	1,36	1,47	1,32	0,17
CT	0,18	0,23	0,24	0,22	0,03

8.3 – Tensão superficial (mN/m) apresentado pelo ensaio com Meio Cooper com 0,1% de glicose com 1% de óleo de fritura (A), 10% de óleo residual de fritura (B) e 10% de óleo diesel (C), em triplicata, a sua média e desvio padrão.

A

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	42,1	40,7	41,3	41,7	0,7
72	40,5	39,4	39,3	39,7	0,7
96	39,1	39,1	39,3	39,2	0,2
120	39,3	39	39,4	39,2	0,2
CT	54,8	53,5	54,8	54,4	0,8

B

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	42,5	39,5	42,7	41,6	1,8
72	39,5	37,3	40,5	39,1	1,6
96	39,3	38,9	41,4	39,9	1,3
120	42	38,2	39,3	39,8	1,9
CT	50,8	50,5	50	50,4	0,4

C

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	46,8	52,6	46,5	48,6	3,4
72	45,3	45,5	47,4	46,1	1,2
96	45,8	47,5	45,3	46,2	1,2
120	45,9	48,1	46,4	46,8	1,2
CT	52,1	53,9	57,6	54,5	2,8

8.4 – Atividade emulsificante do tipo O/A (densidade óptica a 610 nm) pelo ensaio com Meio Cooper com 0,1% de glicose com 1% de óleo residual de fritura (A), 10% de óleo de fritura (B) e 10% de óleo diesel (C), em triplicata, a sua média e desvio padrão.

A

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	1,04	0,95	1,06	1,02	0,06
72	0,71	1,1	1,1	0,97	0,23
96	0,82	1,2	1,28	1,1	0,25
120	0,78	1,11	1,04	0,98	0,17
CT	0,25	0,28	0,21	0,25	0,04

B

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	0,84	0,97	0,94	0,92	0,07
72	0,97	0,9	0,92	0,93	0,04
96	0,97	1	0,94	0,97	0,03
120	0,98	1,04	1,25	1,09	0,14
CT	0,26	0,22	0,24	0,24	0,02

C

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	1,33	0,17	0,92	0,81	0,59
72	1,49	1,2	1,32	1,34	0,14
96	1,36	1	1,13	1,16	0,18
120	1,13	1,32	1,31	1,25	0,10
CT	0,13	0,16	0,24	0,18	0,06

8.5 – Tensão superficial (mN/m) apresentado pelo ensaio com Meio Robert (A) e Meio Kim (B) com 1% de óleo residual de fritura, em triplicata, a sua média e desvio padrão.

A

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	39,8	40,7	36,5	39	2,2
72	35	36,8	36,7	36,2	1,0
96	35,3	35,9	38,7	36,7	1,8
120	34,5	34,5	36,7	35,2	1,3
CT	48,8	41,9	45,5	45,4	3,4

B

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	40,8	42,8	46,3	43,3	2,8
72	41	40,6	37,7	39,8	1,8
96	38,6	38,4	36,2	37,7	1,3
120	39,3	34,7	40	38	2,9
CT	58,8	50,9	53	54,2	4,1

8.6 – Atividade emulsificante do tipo O/A (densidade óptica a 610 nm) apresentados pelos ensaios com Meio Robert (A) e Meio Kim (B) com 1% de óleo de fritura, em triplicata, a sua média e desvio padrão.

A

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	0,7	0,53	0,6	0,61	0,08
72	1,12	0,82	0,8	0,91	0,18
96	1,02	0,95	1,45	1,14	0,27
120	0,5	0,88	1,27	0,88	0,38
CT	0,02	0	0	0,006	0,01

B

Tempo de cultivo	Ensaio/Repetições			Média	Desvio Padrão
	1	2	3		
48	1,02	0,99	0,71	0,91	0,17
72	1,09	1,26	1,22	1,19	0,09
96	1,31	1,34	0,89	1,18	0,25
120	1,23	1,48	1,28	1,33	0,13
CT	0,097	0,092	0,084	0,091	0,006