UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Amanda de Araújo Alencar

PRODUÇÃO DE BACITRACINA POR *Bacillus licheniformis* (UCP1010) UTILIZANDO MEIO ALTERNATIVO À BASE DE SORO DE LEITE

Recife
2011

Amanda de Araújo Alencar

PRODUÇÃO DE BACITRACINA POR *Bacillus licheniformis* UCP1010 UTILIZANDO MEIO ALTERNATIVO À BASE DE SORO DE LEITE

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Co-orientador (a): Prof[a]. Dr[a]. Kaoru Okada

Recife

2011

A368p Alencar, Amanda de Araújo
Produção de bacitracina por Bacillus licheniformis (UCP1010) utilizando meio alternativo à base de soro de leite / Amanda de Araújo Alencar ; orientador Carlos Alberto Alves da Silva ; co-orientador Kaoru Okada, 2011.
x, 65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2011.

1. Antibióticos. 2. Glicose. 3. Bacitracina. 4. Soro de leite. I. Título.

CDU 574.6

PRODUÇÃO DE BACITRACINA POR *Bacillus licheniformis* UCP1010 UTILIZANDO MEIO ALTERNATIVO À BASE DE SORO DE LEITE

Amanda de Araújo Alencar

Examinadores:

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
(Orientador)

Profª. Drª.Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UFPE
(Titular interno)

Profª. Drª.Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
(Titular externo)

Suplentes:

Profª. Drª. Leonie Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco
(Suplente interno)

Profª. Drª. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal de Pernambuco
(Suplente externo)

Dedico

Aos meus pais e irmãos, por compreenderem que todas as coisas têm o seu tempo.

A Rafael, pelo amor e incentivo que me fazem crescer.

"O papel do infinitamente pequeno é infinitamente grande."
Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

A Deus, por direcionar sempre as minhas escolhas e me fortalecer nas dificuldades.

À minha família, pais, irmãos e cunhados, pela confiança, apoio e companheirismo em todas as etapas.

A Rafael, pela dedicação e presença constantes, por compreender as minhas ausências e pelo amor que sempre me ajuda a superar os obstáculos encontrados.

Aos familiares e amigos que torcem por mim e compreendem o meu desejo de aprender mais.

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), por me possibilitar subir mais um degrau. Em especial, ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), pelo acolhimento e por despertar em mim o fascínio pela Microbiologia.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo suporte financeiro, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa no intercâmbio PROCAD/CAPES, realizado no segundo semestre de 2009.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva e Prof^{a}. Dr^{a}. Kaoru Okada, pela oportunidade e por contribuírem para o meu crescimento.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Galba Maria de Campos Takaki, coordenadora do NPCIAMB/UNICAP, pela disponibilidade e por acreditar no nosso potencial.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Clarissa Daisy Albuquerque, pelo auxílio com as análises estatísticas.

À Prof^{a}. Dr^{a}. Alexandra Amorim, ao Prof. Dr. Valdemir Alexandre e à Prof^{a}. Dr^{a}. Eliane Vasconcelos, pela contribuição prestada.

Aos colegas de turma, Ana Cláudia Nascimento, Jaceline Lima, Graça Cabral, Marcelo Andrade, Carlos Vilar e Ladiel Tavares, pelos momentos de convivência e pela troca de experiências que nos trouxeram um imenso aprendizado.

Às alunas de iniciação científica, Amanda Sales e Amanda Mota, pela oportunidade de aprender e de ensinar, como também pela amizade construída.

Aos funcionários do NPCIAMB, Severino Humberto, André Felipe e Sônia Maria, pela disposição em auxiliar na execução dos experimentos. E aos demais colegas de laboratório, pelo conhecimento compartilhado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

E às dificuldades que surgiram pois, ao serem superadas, tornam essa conquista mais valiosa e gratificante.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS v

SUMÁRIO vi

LISTA DE FIGURAS vii

LISTA DE TABELAS viii

RESUMO ix

ABSTRACT x

CAPÍTULO I

1.1. **Introdução** 12

1.2. **Objetivos** 14

1.2.1. Objetivo geral 14

1.2.2. Objetivos específicos 14

1.3. **Revisão da literatura** 15

1.3.1. Microrganismos e biotecnologia 15

1.3.2. O gênero Bacillus 16

1.3.3. Antibióticos 21

1.3.3.1. Bacitracina 25

1.3.4. A indústria de laticínios 28

1.3.4.1. A produção de queijo no Nordeste 30

1.3.5. Rejeitos industriais 32

1.3.5.1. Soro de leite 35

REFERÊNCIAS 40

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE BACITRACINA POR *Bacillus licheniformis* (UCP1010) EM SORO DE LEITE EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL 47

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS 62

ANEXOS 63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Micrografia eletrônica de *B. licheniformis.* 17

Figura 2 -Estrutura geral da bacitracina. 27

Figura 3 - Esquema do processo de fabricação do queijo. 30

CAPÍTULO II

Figura 1 – Curva de crescimento celular, variação do pH e consumo de glicose no decorrer do processo fermentativo em ensaio com maior produção de bacitracina por *B. licheniformis*. 53

Figura 2 - Influência da temperatura na produção de bacitracina por *B. licheniformis*..... 55

Figura 3 - Zonas de inibição obtidas na fermentação realizada a 37 °C, após 60h(A), 72h(B) e 84h(C). 55

Figura 4 - Diagrama de Pareto para a resposta atividade antibiótica, após 72h de incubação. 56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Frequência associada à ocorrência de bactérias do gênero *Bacillus* no solo. 18

Tabela 2 - Composição do soro de queijo doce e ácido. 36

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2^3. 50

Tabela 2 – Matriz decodificada dos ensaios realizados e variável resposta do planejamento fatorial 2^3 para produção de bacitracina por *B. licheniformis*. 52

RESUMO

A bacitracina é um dos mais importantes antibióticos polipeptídicos, produzido por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*, funcionando como inibidor da biossíntese da parede celular. O soro de leite é um rejeito da fabricação de queijos de alto valor nutricional, sendo considerado um poluente extremamente problemático devido à elevada carga orgânica e grande volume gerado. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial biotecnológico de *B. licheniformis* UCP1010, isolada de solo contaminado por petróleo, na produção de bacitracina, utilizando meios formulados à base de soro de leite, em substituição ao ácido glutâmico e utilizando glicose como fonte adicional de carbono. Foi empregado um planejamento fatorial 2^3, variando as condições de temperatura, concentrações de glicose e de soro de leite, tendo como variável resposta o diâmetro do halo produzido pelo microorganismo. A produção foi detectada através do teste de difusão em disco, utilizando *Micrococcus flavus* como micro-organismo teste. Os resultados obtidos evidenciaram a presença de halos com diâmetros variando entre 11mm e 27mm, em todas as temperaturas estudadas. No entanto, a melhor produção ocorreu a 37°C, em pH alcalino, após 72h de crescimento microbiano. De acordo com o planejamento fatorial utilizado, os ensaios realizados nas condições do ponto central apresentaram melhor potencial para produção de bacitracina. Tal fato indica que as concentrações de soro de leite 40% (v/v) e de glicose 20g/L mostraram-se mais eficientes para a produção do antibiótico. Assim, pode-se concluir que o micro-organismo estudado possui potencial para produção de antibióticos utilizando soro de leite como substrato, evitando que esse resíduo seja descartado no meio ambiente.

Palavras-chave: antibióticos; glicose; soro de leite.

ABSTRACT

Bacitracin is a major polypeptide antibiotics produced by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, functioning as an inhibitor of cell wall biosynthesis. Whey is a waste of the cheese manufacture of high nutritional value and is considered a pollutant extremely problematic due to his high organic load and high volume generated. This work aimed to study the potential of biotechnology of *B. licheniformis* UCP1010, isolated from soil contaminated by oil, through the production of bacitracin, using mediums formulated by whey basis, replacing the glutamic acid and using glucose as a additional source of carbon. It uses a 2^3 factorial design, varying conditions of temperature, concentrations of glucose and whey, having the response variable diameter of the halo produced by the microorganism. The production was detected by disk diffusion test, using *Micrococcus flavus* as microorganism test. The results showed the presence of halos with diameters ranging from 11mm and 27mm, at all temperatures studied. However, the best production occurred at 37 °C, at alkaline pH, after 72 h of microbial growth. According to the experimental design used, tests performed under the conditions of the central point showed best potential for production of bacitracin. This fact indicates that the whey concentration of 40% (v/v) and 20 g/L of glucose were more efficient for the production of the antibiotic. Thus, it's possible to conclude that the microorganism studied has potential for antibiotic production using whey as substrate preventing that waste being discarded into the environment.

Keywords: antibiotics; glucose; whey.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO 1

1.1. Introdução

A biotecnologia pode ser definida como o ramo da tecnologia que consiste em aplicar dados da engenharia e da biologia aos problemas decorrentes da interação do homem com o ambiente (PENNA e CANOLA, 2009). A Federação Europeia de Biotecnologia a define como sendo a aplicação prática de organismos vivos e seus componentes subcelulares, para a indústria de produção de serviços e para a conservação do meio ambiente (LOPES, SCHEMBERGER e TRINDADE, 2008).

Antibióticos são substâncias produzidas por microrganismos, que em baixa concentração podem destruir ou inibir o crescimento de outras espécies microbianas. O termo tem sido estendido para incluir substâncias quimicamente produzidas e seus derivados (FARZANA et. al., 2004). São reconhecidos como um único meio eficaz de controlar o crescimento microbiano, depois da descoberta da penicilina e outros agentes antimicrobianos, por Alexander Fleming (1928). Desde essa época, são contínuas as pesquisas visando a obtenção de antibióticos efetivos para suportar a ameaça emergente de resistência às drogas entre os microrganismos de todo o mundo (KUTA, NIMZING e ORKA`A, 2009).

Bacitracina é um composto químico que contém um ou mais polipeptídeos antimicrobianos produzidos por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* e age como inibidor da síntese da parede celular (FARZANA et. al., 2005). Tem ação contra muitos organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, cocos anaeróbios, *Corynebacter* e *Clostridium*, mas não tem efeito contra organismos Gram-negativos (AL-JANABI, 2006). A adição de bacitracina ao zinco, junto com sulfato de neomicina e polimixina, são os ingredientes comuns na formulação de pomadas para o tratamento de infecções oftalmológicas e queimaduras leves (SIN e WONG, 2003). Além disso, é amplamente utilizada como suplemento alimentar animal, sendo importante para as indústrias farmacêutica e pecuária de todo o mundo (QI et. al., 2008)

Bacillus são bactérias Gram-positivas, a maioria saprófitas, em forma de bastão, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (AWAIS et. al., 2007). Ocorrem

principalmente no solo, e por serem formadoras de esporos, têm capacidade de sobrevivência neste ambiente. Os metabólitos biologicamente ativos produzidos pelos representantes do gênero *Bacillus* vêm sendo amplamente estudados na literatura científica. Possuem ampla aplicação e importância em vários setores industriais, como: alimentos, obtenção de hidrolisados proteicos, couro, detergentes, além da produção de antibióticos (MANNANOV e SATTAROVA, 2001; AL-JANABI, 2006; DIAS et. al., 2008).

B. licheniformis pode ser isolado de solos e material vegetal, sendo distribuído como um organismo saprófita no meio ambiente. Ao contrário de outras bactérias do gênero, que são predominantemente aeróbias, o *B. licheniformis* é um anaeróbio facultativo, o que permite que ocorra em uma variedade maior de nichos ecológicos. Esse microrganismo e seus produtos extracelulares possuem numerosas aplicações comerciais e na agricultura. Nunca foi reportado como sendo patogênico a animais ou a plantas, e é utilizado na produção industrial de proteínas e exoenzimas. Cepas específicas de *B. licheniformis* são também aplicadas na produção do polipeptídeo bacitracina (VEITH et. al., 2004; LIANG et. al., 2009).

Por outro lado, o soro de leite é um rejeito resultante da fabricação do queijo e contém boa parte dos componentes presentes no leite, como proteínas (0,6-0,8%), lactose (4,5-5%), sais minerais (0,7%) e lipídeos (0,4-0,5%), além de aminoácidos e vitaminas como, tiamina, riboflavina, vitaminas B6 e B12 e o ácido pantotênico. Assim, o soro de leite pode ser considerado um agente poluidor, se descartado no ambiente, ou um produto nobre, pela sua rica composição devido ao teor de nutrientes (EL-BENDARY, MOHARAM e FODA, 2008; BARBOSA et al., 2010).

Atualmente, com o aumento da produção de queijos pelas indústrias de laticínios, torna-se necessário o aproveitamento do soro líquido proveniente desse processo. O soro de leite apresenta sabor ligeiramente ácido ou doce, contudo a sua constituição química depende da técnica de coagulação e fabricação do queijo. No Brasil, o soro de leite é ainda um rejeito de elevada preocupação, pois é estimado que somente 15% da produção anual, aproximadamente 70.000 toneladas, seja utilizada em outros setores industriais (DIAS et. al., 2008; LIRA et. al., 2009). Neste sentido, investigações devem ser conduzidas na busca de fontes alternativas e de baixo custo para produção de insumos de elevado valor biotecnológico.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico da amostra *B. licheniformis* (UCP1010) isolada de solo contaminado por petróleo, através da formulação de meios alternativos à base de soro de leite, rejeito da indústria agropecuária, na produção de bacitracina.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a cinética de produção da bacitracina, através da utilização de soro de leite como componente do meio de produção e avaliar a influência da temperatura e do pH na produção do antibiótico;

- ✓ Investigar a influência das concentrações de glicose e de soro de leite no processo fermentativo, através de modificações na composição do meio de produção da bacitracina;

- ✓ Utilizar um planejamento fatorial 2^3 para avaliar a eficiência da composição dos meios alternativos na produção da bacitracina;

- ✓ Avaliar o consumo de glicose pelo *B. licheniformis* durante a produção da bacitracina.

1.3. Revisão da literatura

1.3.1. Microrganismos e biotecnologia

A biotecnologia é um conjunto de técnicas que utilizam seres vivos no desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e/ou social dos seres humanos. É considerada uma área interdisciplinar, pois envolve diferentes ramos do conhecimento e seus produtos e processos são obtidos pela união dos conhecimentos de diferentes técnicas e esforço de diferentes especialistas (LOPES, SCHEMBERGER e TRINDADE, 2008). As linhas de pesquisa em biotecnologia são muitas, como: melhoramentos genéticos, desenvolvimento de vacinas, biotecnologia vegetal e animal, métodos moleculares de detecção de agentes patogênicos, isolamento de extratos e modificação de biomoléculas para diversos fins. A biotecnologia moderna está avançando muito rápido, trazendo, como consequência, uma contribuição significativa nas diversas áreas do conhecimento, como na agropecuária, agroindústria, medicina e meio ambiente (VÁSQUEZ, 2008). A aplicação da biotecnologia no mundo tem se mostrado eficaz no cumprimento de uma série de necessidades humanas básicas, como alimentação, saúde, energia e proteção do meio ambiente (DEREJE, 2011).

Há centenas de anos o homem já utilizava os conhecimentos da biotecnologia, contudo, de forma limitada apenas aos processos fermentativos da uva, milho e mandioca para obtenção de bebidas alcoólicas. Em seguida, observou-se que, tanto a pele como a semente da uva produziam, de modo natural, o fermento responsável pela origem do pão. Esta reação química constitui a transformação de um elemento vivo e pode ser denominada de biotecnologia tradicional. As inovações tecnológicas deram origem à biotecnologia moderna, termo que foi conceituado pela CDB (Convenção sobre Diversidade Biológica) como: “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica” (DIAS, 2010)

A aceitação da biotecnologia nos últimos 25 anos tem sido típica de qualquer nova tecnologia, com uma lenta fase inicial seguida por um período de rápido crescimento e posterior fase madura no processo de consolidação. A biotecnologia é

vista como sendo uma forte e confiável tecnologia, relativamente de baixo risco, capaz de ser implementada em larga escala e em grande variedade de setores industriais. O impacto da biotecnologia até a presente data tem sido maior no setor farmacêutico, mas está claro que existe um enorme potencial também em outros setores para a sua aplicação. A biotecnologia é reconhecida universalmente como uma das principais tecnologias capacitadoras no século 21. A confiança nessa visão decorre de sua posição como uma inovação radical, do impacto que ela tem tido e terá ainda sobre problemas globais, como doenças e poluição ambiental, promessa de sustentabilidade industrial e da percepção de que se tornou uma tecnologia madura capaz de fornecer competitividade econômica, geração de novos mercados e ampla aplicabilidade industrial (BULL, WARD e GOODFELLOW, 2000). Por outro lado, a humanidade depende de um ambiente ecologicamente equilibrado para se desenvolver e sobreviver. Desta forma, o desenvolvimento de biotecnologias exerce um papel preponderante na busca de uma relação mais equilibrada entre os seres humanos e o ambiente (PENNA e CANOLA, 2009).

Em qualquer processo industrial biotecnológico, a alta produtividade é um fator essencial para o sucesso comercial. A máxima produtividade específica de produção de uma espécie é geralmente independente dos parâmetros do processo e determinada pelas propriedades genéticas e fisiológicas do organismo (NIU et. al., 2009). A fermentação natural e espontânea é uma rica fonte para novos microrganismos com potencial industrial. O gênero *Bacillus* apresenta ampla distribuição em diversos ambientes e tem sido objeto de atenção para aplicação de seus membros em biotecnologia. Estas bactérias são relativamente fáceis de isolar e também capazes de crescer em meios complexos e sintéticos (DIAS et. al., 2008).

1.3.2. O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é um dos maiores e mais ubíquos gêneros de bactérias existentes, contendo 65 espécies consideradas válidas (NIKEREL, ATES e ONES, 2008). Desde o século XIX, esse gênero bacteriano tem sido descrito com base na sua habilidade de motilidade e esporulação, evidenciando a morfologia e presença de flagelos que o diferencia do gênero *Clostridium*. De acordo com Sneath (1986), as espécies do gênero *Bacillus* são descritas como aeróbios que degradam gelatina

e formam colônias do tipo rizoide. Distinguem-se do outro gênero da família Bacillaceae – *Clostridium* – na forma de seus esporos e na utilização de oxigênio (PAZ, 2005).

As espécies do gênero *Bacillus* (Figura 1) são conhecidas por habitar o solo, sendo descritas na literatura como resistentes a altas e baixas temperaturas, sendo considerados organismos versáteis. A habilidade desses organismos de sobreviver melhor em ambientes secos é uma clara indicação de que essa espécie é considerada xerófita (KUTA, NIMZING e ORKA'A, 2009).

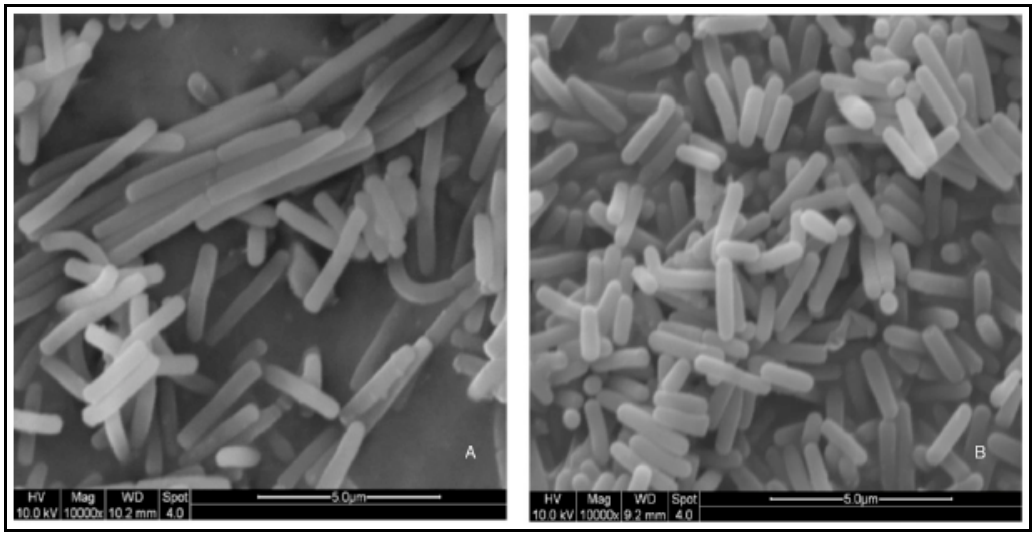

Figura 1 - Micrografia eletrônica de *B. licheniformis.*
Fonte: NIU et. al., 2009.

O estudo taxonômico da família Bacillaceae evoluiu bastante nos últimos anos com o desenvolvimento das técnicas moleculares (RNA 16S), contudo sua identificação e classificação ainda são dificultadas, sendo necessário o emprego da combinação dos métodos tradicionais aos quimiotaxonômicos, moleculares e genéticos para se obter um perfil completo e definido. São sapróbios, embora algumas espécies sejam consideradas patogênicas. Algumas espécies compõem a biota intestinal humana e seus representantes considerados patogênicos ao homem são: *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus* (PAZ, 2005), contudo o *B. cereus* possui mais características adaptativas quando comparado a outras espécies do gênero, isoladas do solo, como mostrado na tabela 1 (KUTA, NIMZING e ORKA`A, 2009).

Tabela 1 - Frequência associada à ocorrência de bactérias do gênero *Bacillus* no solo.

Organismos	Frequência de ocorrência (%)
Bacillus cereus	30,8
B. brevis	1,9
B. polymyxa	3,8
B. licheniformis	13,5
B. sphaericus	7,7
B. mycoides	13,5
B. pumilus	7,7
B. subtilis	3,8
B. alvei	1,9
B. laterosporous	1,9
B. firmus	9,6
B. circulans	3,8

Fonte: KUTA, NIMZING e ORKA`A, 2009.

As bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas aeróbias ou anaeróbias facultativas, esporuladas em forma de bastão, amplamente distribuídas na natureza, sendo consideradas cosmopolitas, por serem encontradas no solo, na água e até na poeira do ar. Possuem uma gama de habilidades fisiológicas que permite o crescimento do microrganismo nos diversos ambientes, competindo favoravelmente com outras bactérias, devido à sua capacidade de formar esporos que produzem metabólitos estáveis ao calor, à radiação e com efeito antagonista sobre outros microrganismos (PAZ, 2005; KUTA, NIMZING, ORKA`A, 2009). Cada célula produz somente um esporo, que é resistente a calor, frio, radiação, dessecação e desinfetantes, cujas habilidades fisiológicas permitem sobrevivência em locais muito extremos, como áreas desérticas, nascentes de água quente e solos árticos (AWAIS et. al., 2007).

A parede celular desse gênero bacteriano é formada por um polipeptídio constituído pelo ácido D-glutâmico, com características antifagocíticas, considerada por muitos estudos como um dos principais aspectos de sua virulência (PAZ, 2005). Assim, essas bactérias podem adaptar-se às diversas transformações ambientais (MANNANOV e SATTAROVA, 2001) e são normalmente encontradas e cultivadas a partir de amostras de solo como habitat primário (NIKEREL, ATES e ONER, 2008).

Uma das principais distinções entre os membros da família Bacillaceae é a produção de catalase, que distingue as espécies de *Bacillus* dos demais. Muitas espécies formam ácido em meios com carboidratos e algumas produzem gases, como *Bacillus macerans* e *Bacillus polymyxa*. Em geral, fermentam glicose, maltose, sacarose e raramente a lactose. Crescem bem em meios definidos, contendo várias fontes de carbono. Muitos produzem enzimas hidrolíticas extracelulares que degradam produtos complexos, como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo aos organismos utilizarem esses produtos como fonte de carbono e doadores de elétrons. Secretam ainda enzimas proteolíticas, hidrolisam a caseína e a gelatina. Algumas espécies produzem hemolisinas e reduzem nitrato. É ampla a diversidade existente na fisiologia desse gênero, no qual as características coletivas incluem a degradação de muitos substratos derivados de plantas e animais como fontes de carbono, incluindo celulose, amido, pectina, proteínas, hidrocarbonetos e outros. Uma característica de algumas espécies é a versatilidade, sendo capazes de utilizar uma variedade de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade, tais como os resíduos da agroindústria (PALLADINO, 2008). Todas as espécies são móveis, exceto *B. anthracis* (PAZ, 2005).

Espécies do gênero *Bacillus* podem ser termofílicas, psicrofílicas, acidofílicas, alcalifílicas, halotolerantes ou halofílicas e são capazes de crescer em valores de pH, temperatura e concentração de sal onde poucos outros organismos podem sobreviver (AWAIS et. al., 2007). Normalmente, a maioria dos representantes desse gênero são considerados mesofílicos, embora existam espécies termofílicas cujas características têm sofrido alterações conforme o ambiente do qual tenha sido isolado. Devido a este fato, o gênero *Bacillus* foi dividido mais recentemente em *Geobacillus,* composto por organismos que crescem acima de 45°C (PAZ, 2005).

As bactérias do gênero *Bacillus* são importantes para a produção industrial, como secretores eficientes de enzimas e produtores de antibióticos, nucleotídeos purina ou vitaminas (TANNLER, DECASPER e SAUER, 2008). É considerado um organismo de importância econômica, por ter uma longa história de produção de proteases, amilases e surfactantes lipopeptídicos, que são utilizados na produção de detergente, liquefação de amido e recuperação de petróleo, respectivamente. Cepas recombinantes de *B. licheniformis* têm sido designadas e usadas consideravelmente em processos fermentativos de larga escala. Várias tentativas têm sido realizadas

para explorar ainda mais essas características, melhorando o rendimento da produção (CLERCK e VOS, 2004). São utilizados na síntese de uma ampla gama de produtos médicos, farmacêuticos, agrícolas, dentre outros. Muitas espécies e cepas do gênero *Bacillus* produzem um grande número de substâncias com ação antimicrobiana, incluindo os antibióticos. Assim, é uma espécie comumente utilizada na indústria biotecnológica (ASLIM, SAGLAM e BEYATLI, 2002; EL-SERSY, EBRAHIM e ABOU-ELELA, 2009; DONG et. al., 2010; TODOROVA e KOZHUHAROVA, 2010; NIMPIBOON et. al., 2011).

É um gênero reconhecido por apresentar muitas espécies que produzem peptídeos com ação bactericida e fungicida. Estes são classificados como metabólitos secundários, secretados para o meio extracelular, onde exercem a ação antimicrobiana (TEIXEIRA, 2007). Muitos deles são produzidos de formas não ribossomais por um largo complexo proteico multifuncional chamado peptídio sintetase não ribossomal. Considerando o fato de que diferentes cepas pertencentes à mesma espécie produzem antibióticos peptídicos diferentes, o antibiótico peptídico produzido por espécies de *Bacillus* é geralmente considerado cepa-específico, em vez de espécie-específico. Contudo, não existem relatos sobre as bases genéticas para a especificidade de antimicrobianos peptídicos produzidos por *Bacillus* (ISHIHARA et al., 2002). Na maioria dos casos, a produção de antibióticos está relacionada ao processo de esporulação (PALLADINO, 2008). Entre os antibióticos peptídicos, eles produzem ainda lipopeptídeos, que são compostos anfifílicos com atividade surfactante (CARVALHO et al., 2010). Algumas cepas de *B. licheniformis* produzem uma variedade de antibióticos peptídicos, como a bacitracina (CLERCK e VOS, 2004).

Espécies do gênero *Bacillus* possuem ainda grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico, sendo capazes de inibir o crescimento de fitopatógenos, como *Alternaria sp*., *Fusarium oxysporium*, entre outros (ANGONESE et. al., 2009; TODOROVA e KOZHUHAROVA, 2010). Membros desse gênero estão entre as bactérias benéficas exploradas na produção de pesticidas, fungicidas e fertilizantes microbianos (PÉREZ-GARCÍA, ROMERO e VICENTE, 2011). De acordo com Clerck e Vos (2004), uma nova bacteriocina, produzida por *B. licheniformis*, tem sido relatada e examinada para uso como conservante alimentar. Ghaly et. al.(2007) demonstraram que espécies de *B. licheniformis* são capazes de

produzir levana a partir da sacarose. É conhecido ainda o potencial biológico das enzimas produzidas pelo gênero, como as proteases produzidas por *B. licheniformis*, utilizadas na indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos. Há ainda as proteases sintetizadas por *B. subtilis*, aplicadas nas indústrias de produção de bebidas e pães (REGINATO e TEIXEIRA, 2009). Preparações à base de bactérias do gênero *Bacillus*, mais recentemente, têm sido introduzidas no mercado internacional, sendo usadas como probióticos para terapia e profilaxia de desordens gastrointestinais, causadas por bactérias em humanos (SOROKULOVA et. al., 2008). Estudos recentes revelam ainda que cepas de *B. licheniformis*, isoladas de esgoto, têm também aplicação na moderna nanotecnologia, através da síntese de nanopartículas, que podem ser utiliizadas como receptores ópticos, catalisadores de reações químicas e agentes antimicrobianos (KALIMUTHU et. al., 2008).

1.3.3. Antibióticos

O fenômeno da antibiose foi descoberto inicialmente por Pasteur em 1877, quando demonstrou a redução do crescimento dos bacilos de antraz na urina, por bactérias transportadas pelo ar (SILVA, 2006). Após a segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram microrganismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide. Nessa época, já eram realizadas pesquisas buscando agentes químicos com atividade antibiótica. O pesquisador Paul Erlich, em 1910, desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, salvarsan, usado contra sífilis. Poucos progressos foram obtidos nos 20 anos seguintes, sendo o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorrido com a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming. A penicilina G, ou benzilpenicilina, foi descrita como agente antimicrobiano em 1929, mas somente introduzida como agente terapêutico em 1940. Após a industrialização da penicilina, especialmente em consequência da Segunda Guerra Mundial, houve um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2010).

A descoberta da penicilina e sua posterior introdução na clínica causou uma verdadeira revolução nos tratamentos em patologia infecciosa. A partir daí, têm sido

incorporados à prática clínica dezenas de famílias de antimicrobianos, com atividade frente a bactérias, fungos, parasitos e vírus (CALVO e MARTINEZ, 2009). Na década de 40, Waksam et al. realizaram pesquisa sistemática de actinomicetos como fontes de antibióticos e descobriram a estreptomicina em 1944. Esse grupo de micróbios do solo demonstrou ser uma rica fonte de antibióticos, e seguiram-se as descobertas de tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina e muitos outros. Nos últimos 40 anos, tem-se focalizado mais a atenção na produção de derivados semi-sintéticos de antibióticos mais antigos, com propriedades mais desejáveis ou diferentes espectros de ação (SILVA, 2006).

A palavra antibiótico é derivada do termo grego antibiose, que significa literalmente “contra a vida”. Pode ser purificado a partir de fermentação microbiana e modificado quimicamente ou enzimaticamente para uso químico ou para estudos fundamentais. Os antibióticos são amplamente distribuídos na natureza, onde exercem uma importante função na regulação da população microbiana de solo, água, esgoto e adubo. Das centenas de antibióticos produzidos naturalmente que tem sido purificados, apenas uns poucos não são tóxicos, podendo ser utilizados na prática médica. Aqueles que são de maior uso atualmente são derivados de um grupo relativamente pequeno de microrganismos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Streptomyces*, *Cephalosporium*, *Micromonospora* e *Bacillus* (AWAIS et. al., 2007).

Mais de 5000 diferentes antibióticos são isolados de culturas de bactérias, fungos e células vegetais, que consistem principalmente de polissacarídeos com microfibrilas de celulose, incorporados em uma matriz de hemicelulose e pectina. Sabe-se que 60% dessas contribuições são oriundas do gênero *Streptomyces*. Na indústria farmacêutica, muitos antibióticos peptídicos importantes são produzidos por espécies de *Bacillus*, como bacitracina, polimixina, gramicidina, tirocidina, subtilina e bacilisina (OLIVERA, 2004; TEIXEIRA, 2007; HASAN et. al., 2009; DYK, et. al., 2010; KAYALVIZHI e GUNASEKARAN, 2010).

Os metabólitos secundários microbianos incluem antibióticos, pigmentos, toxinas, efetores da competição e simbiose ecológica, ferormônios, inibidores de enzimas, agentes imunomoduladores, receptores antagonistas e agonistas, pesticidas, agentes antitumorais e promotores de crescimento de animais e plantas. Sua formação é regulada por nutrientes, taxa de crescimento, controle de *feedback*,

inativação e indução enzimáticas, enquanto sua regulação é influenciada por compostos de baixo peso molecular, transferência de RNA, fatores sigma e produção de genes formados durante o desenvolvimento pós-exponencial (DEMAIN, 1998). Cerca de 23.000 compostos bioativos, metabólitos secundários, produzidos por microrganismos têm sido relatados e apenas 150 deles são utilizados em farmacologia, agricultura ou outros campos (OLANO et. al., 2008).

O contato diário com microrganismos capazes de provocar infecções é inevitável. Para combater essas infecções, recorre-se aos antibióticos. Tratam-se de substâncias utilizadas para o tratamento de infecções bacterianas, atuando de forma bacteriostática, inibindo o crescimento bacteriano, ou bactericida, quando eliminam as bactérias causadoras da infecção (MONTEIRO et. al., 2010).

Antibióticos são moléculas de baixo peso molecular (não-protéicas), produzidas como metabólitos secundários, principalmente por microrganismos que vivem no solo. Um pressuposto natural é que os microrganismos do solo produzem antibióticos em seu habitat natural e os utilizam para ganhar vantagem contra seus competidores (JAMIL et. al., 2007). Podem ter origem microbiana, sintética ou semi-sintética, quando parte da molécula é produzida por microrganismo e outra é adicionada sinteticamente (OLIVERA, 2004). Caracterizam-se também como sendo os medicamentos mais usados de maneira excessiva e indiscriminada, o que auxilia a gerar o maior problema da antibioticoterapia: a resistência dos microrganismos aos antibióticos (SILVA, 2006).

O sucesso no desenvolvimento de antibióticos para a cura de infecções microbianas pode ser considerado como um dos maiores sucessos científicos do século passado. Os antimicrobianos são responsáveis por uma redução expressiva na mortalidade causada por microrganismos patogênicos. A indústria de antibióticos tem se desenvolvido a partir de origens modestas, logo após a Segunda Guerra Mundial, para tornando-se na atualidade um dos mais importantes setores da indústria biotecnológica e farmacêutica (KOLLER et. al., 2011).

Do ponto de vista molecular, os antimicrobianos de uso clínico exercem sua ação em algumas das seguintes estruturas e funções bacterianas: inibindo a síntese da parede celular, alterando a integridade da membrana citoplasmática, impedindo a síntese proteica ou impedindo a síntese ou as funções dos ácidos nucleicos. Existem ainda antibióticos que tem como função proteger outros compostos das

enzimas hidrolíticas bacterianas, como é o caso dos inibidores de β-lactamases (CALVO e MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2009).

Antibióticos peptídicos formam um grupo incomparável de moléculas bioativas, dividindo-se em duas grandes classes, de evolução biológica é muito diferente, dependendo da sua biossíntese. A primeira é uma grande e heterogênea categoria de peptídios que são sintetizados em grandes e modulares complexos enzimáticos, por bactérias e fungos. Este grupo inclui aqueles antibióticos não sintetizados ribossomalmente, como a bacitracina, gramicidina, polimixina, streptogramina e seus derivados. A segunda categoria é muito diferente, compreendendo peptídeos lineares, composta quase que inteiramente de resíduos de aminoácidos convencionais, que são produzidos por todos os principais tipos de organismos (incluindo microrganismos). Os peptídeos produzidos por bactérias e sintetizados ribossomalmente são conhecidos como bacteriocinas. Muitos antibióticos peptídicos têm formas estruturais originais, tais como estruturas cíclicas, contendo aminoácidos incomuns e são muitas vezes modificados e conjugados com açúcares, lipídios e outras moléculas. Dependendo dos aminoácidos que o compõem e dos seus conjugados, os seus mecanismos de ação podem variar consideravelmente. Alguns dos antibióticos peptídicos incluem alguns bem conhecidos ou comumente utilizados, como bacitracina, polimixina, vancomicina, penicilina, cefalosporina, entre outros (OLIVERA, 2004; JAMIL et. al., 2007).

A maioria dos antibióticos produzidos por *Bacillus* sp. são peptídeos de baixo peso molecular, produzidos via biossintética não-ribossomal, que envolve enzimas específicas, chamadas peptídeo sintetases. Geralmente são produzidos nas fases iniciais do processo de esporulação (HASAN et. al., 2009; DYK, et. al., 2010). De acordo com Jamil et. al. (2007), a quantidade de antibióticos produzidos por espécies do gênero *Bacillus* se aproxima de 167, e são principalmente polipeptídeos. Independentemente da toxicidade de alguns antibióticos produzidos por essas bactérias às células de mamíferos, eles continuam sendo foco de atenção de cientistas. A maior parte deles exerce ação contra bactérias Gram-positivas, no entanto, compostos como polimixina, colistina e circulina exibem atividade quase exclusivamente sobre organismos Gram-negativos, enquanto que bacilomicina, micobacilina e fungistatina são agentes efetivos contra fungos filamentosos e

leveduras. *B. licheniformis* produz vários antibióticos polipeptídicos, como bacitracina, liqueniformina, liquenisina e amoebicina (ISHIHARA et. al., 2002).

Apesar da disponibilidade de novos agentes antibacterianos, os antibióticos polipeptídicos continuam a desempenhar um papel no tratamento de infecções causadas por microrganismos em humanos e terapia veterinária. Estes antibióticos, obtidos por fermentação, podem conter diversas substâncias intimamente relacionadas, cujo montante total é bastante vasto, e que são bastante difíceis de separar, porque suas propriedades são idênticas às do composto principal. Em tempos em que a qualidade e a segurança das substâncias farmacêuticas são questões tão importantes, para muitos destes antibióticos os níveis de impurezas são limitados, mas suas identidades raramente são especificadas. Tentativas têm sido feitas por diferentes grupos de pesquisa para caracterizar polipeptídeos antibióticos comercialmente disponíveis, como gramicidina, polimixina B, polimixina e bacitracina (GOVAERTS et. al., 2003).

Estes peptídeos possuem uma variedade de notáveis atividades biológicas, incluindo atividades antimicrobianas, antivirais e antitumorais. Mais de 500 antibióticos peptídicos foram descritos na metade do século passado. Estes diferem amplamente em suas propriedades bioquímicas (composição de aminoácidos, comprimento e estrutura secundária). Entretanto, todos eles desempenham um papel essencial na defesa não-específica do hospedeiro, por prevenir ou limitar infecções, por meio da capacidade que possuem de reconhecer seletivamente potenciais agentes patogênicos (HASAN et. al., 2009).

Ainda há muito a ser feito para entender as propriedades dos antibióticos peptídicos, especialmente *in vivo*, e avaliar a importância de diferentes fatores de virulência das bactérias. Estudos continuam a ser desenvolvidos por cientistas em volta do mundo nos próximos anos, sendo os resultados utilizados pela indústria farmacêutica, contribuindo na luta contra os patógenos microbianos (DUBIN et. al., 2005).

1.3.3.1. Bacitracina

É um antibiótico polipeptídico produzido por espécies de *B. licheniformis* e *B. subtilis*, comumente usada conta microrganismos Gram-positivos. É comercialmente

produzida em larga escala em todo o mundo como aditivo alimentar para animais e, na medicina humana é encontrada na forma de pomadas (INJAC et. al., 2008; EPPERSON e MING, 2000). Estas são formuladas com base na adição de bacitracina de zinco, sulfato de neomicina e polimixina, que são ingredientes comuns na formulação de pomadas para o tratamento de infecções oftalmológicas e queimaduras leves, como Neosporin e Polysporin (EPPERSON e MING, 2000; SIN e WONG, 2003). Devido à sua ampla utilização como suplemento alimentar animal e à sua aplicação médica, a bacitracina é importante para as indústrias farmacêutica e pecuária em todo o mundo (QI et. al., 2008).

Foi descoberta em 1943, a partir de uma cultura bacteriana isolada de um ferimento de uma garota americana de 7 anos de idade (SIN e WONG, 2003; QI et. al., 2008). Os microrganismos sensíveis à bacitracina são a maioria das bactérias Gram-positivas, essencialmente o *Staphylococcus pyogenes*. Os estreptococos beta-hemolíticos dos grupos C e G são menos sensíveis, mas o grupo B é usualmente resistente. Os meningococos e os gonococos são sensíveis, mas os Gram-negativos são resistentes (SILVA, 2006). Além de sua atividade contra cocos e bacilos Gram-positivos, exercem ação também sobre algumas espécies do Reino Archaea, como *Methanobacterium*, *Methanococcus* e *Halococcus* (QI et. al., 2008).

De composição e estrutura complexas, anteriormente foi relatado como um componente único. Hoje em dia, a bacitracina é determinada como uma complexa mistura de mais de cinquenta diferentes formas. Consiste de um heptapeptídeo circular ligado a uma cadeia pentapeptídica, sendo variáveis os radicais ligados à cadeia (Figura 3). Algumas bacitracinas consistem do mesmo radical R, outras são definidas por diferentes radicais R. O radical é determinado por um tipo de tiazolina circular com diferentes substituintes. As várias estruturas de bacitracina são nomeadas: A, B1, B2, B3, C1, C2, C3, E, F, G1, H2, G3, I1, I2, I3. (SCHEIDL et. al., 2009). Embora as estruturas químicas de alguns componentes ainda não sejam conhecidas, a bacitracina A e uma série de outras como as bacitracinas B, C, D, E, F, H e I foram identificadas (SIN e WONG, 2003).

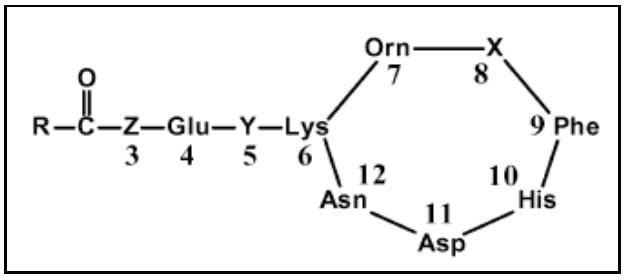

Figura 2 -Estrutura geral da bacitracina.
Fonte: GOVAERTS et. al., 2003.

As preparações comerciais de bacitracina são compostas por uma mistura de muitos análogos intimamente relacionados. Sabe-se que as bacitracinas A e B são responsáveis por 95% da atividade biológica dessas misturas. A bacitracina é um dodecapeptídeo metal-dependente, consistindo de grupos peptídicos intimamente relacionados, sendo a bacitracina A o principal componente. É sintetizada por um sistema de enzimas multifuncional, composto de bacitracina sintetases 1, 2 e 3, codificadas pelos genes bacitracina sintetases, *bacA*, *bacB* e *bacC*, respectivamente, e é instável a altas temperaturas e à luz (ISHIHARA et. al., 2002; QI et. al., 2008; INJAC et. al., 2008;).

Além de ser comumente utilizado em algumas preparações tópicas, tanto em medicina humana como veterinária, este potente antibiótico tem sido testado também, com sucesso limitado, para eliminação de *Enterococcus* resistente à vancomicina. Não é administrado sistematicamente devido à sua nefrotoxicidade, mas é considerado seguro quando tomado por via oral se o trato gastrointestinal não absorve quantidades significativas da droga (MATOS et. al., 2009).

Desde a sua descoberta, em 1945, a bacitracina foi utilizada sistematicamente em infecções estafilocócicas graves, até meados de 1960. No entanto, devido à sua nefrotoxicidade e ao surgimento de novos antibióticos é indicada apenas para uso tópico. Quando usada localmente, a droga não provoca, praticamente, efeitos adversos. Assim, a bacitracina é usada sob a forma de cremes, unguentos, sprays, pós e soluções e, em geral, associada à neomicina e à polimixina B (SILVA, 2006).

Atua como um inibidor da síntese da parede celular, apesar de também poder interferir em outros processos celulares (MATOS et. al., 2009). Seu principal modo de ação é através da inibição da síntese de peptidioglicano (MURPHY et. al., 2008). O modo de ação da bacitracina implica na formação de um complexo com o lipídio

C_{55}-isoprenil pirofosfato (IPP), que é mediada por íons metálicos divalentes. Essa captura de IPP impede a desfosforilação do IPP e assim interrompe a síntese da parede celular. Íons metálicos divalentes, como Co^{+2}, Mn^{+2}, Zn^{+2} e Cu^{+2}, são essenciais para a atividade antimicrobiana da bacitracina. Embora a resistência bacteriana para praticamente todos os antibióticos do mercado tenha se tornado um problema de saúde nos últimos anos, a resistência bacteriana à bacitracina é ainda limitada, apesar dela ter sido usada amplamente nas últimas décadas. Desse modo, a bacitracina pode ter um potencial para a formação de potentes antibióticos metalopeptídicos e análogos, com limitada capacidade de gerar resistência bacteriana, no combate a infecções microbianas (QI et. al., 2008).

B. licheniformis possui mecanismos de auto-resistência contra a bacitracina, que são baseados no aumento da concentração de isoprenil pirofosfato (IPP) e a expressão do transportador de bacitracina, denominado ABC, composto por duas proteínas hidrofóbicas, que atuam como um canal transmembrana, controlando o efluxo de bacitracina para fora da célula (MURPHY et. al., 2008). O mecanismo de ação da bacitracina consiste na interferência da biossíntese da parede celular bacteriana, inibindo a 2ª fase da biossíntese com desfosforilação de um pirofosfato lipídico. Parece também lesar a membrana citoplasmática e, diferentemente das penicilinas, também atinge os protoplastos (SILVA, 2006).

Entre 1997 e 1999, alguns antibióticos promotores de crescimento, incluindo a bacitracina, foram retirados como promotores de crescimento na União Europeia, com base no Princípio da Precaução. Apesar de, para este fim, estar banida na Europa desde 1999, a bacitracina é ainda usada para este propósito em outros países, como Nova Zelândia. Uma década depois da retirada deste antibiótico da alimentação animal na Europa, alguns relatos surgiram recentemente revelando importante detecção fenotípica de resistência à bacitracina (MATOS et. al., 2009).

1.3.4. A indústria de laticínios

A cadeia produtiva do leite é um importante segmento da indústria alimentícia, responsável por cerca de 12% do total do valor produzido no ramo industrial de alimentos (ALVES, 2008). O leite é a secreção produzida pela glândula mamária de mamíferos com a finalidade de nutrir seus filhotes, sendo rico em diversos nutrientes

como proteínas, lipídios, açúcares, vitaminas e minerais, necessários para seu crescimento e desenvolvimento (COSTA; JIMÉNEZ-FLORES e GIGANTE, 2009). Contém 3,9% de gordura, 3,3% de proteínas, 5,0% de lactose e 0,7% de minerais (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008).

O leite e produtos lácteos derivados de outros mamíferos, especialmente vacas, búfalas, cabras e ovelhas, têm sido utilizados há milênios na nutrição humana, por ser excelente fonte de energia e nutrientes. A composição do leite varia entre as espécies e, em menor intensidade, mesmo dentro da mesma espécie animal. Embora aparente ser um líquido homogêneo, estruturalmente é uma mistura bastante complexa de componentes (COSTA; JIMÉNEZ-FLORES e GIGANTE, 2009). Constitui a matéria-prima do fabrico de uma série de produtos, como bebidas lácteas, leite fermentado, coalhada, queijos, leite em pó, manteiga, creme de leite, requeijão, iogurte, doce de leite, leite condensado, leite pasteurizado (integral e desnatado), leite UHT, ricota, sobremesas lácteas, soro de leite, soro de leite em pó (ALVES, 2008).

Em 2004, o Brasil assumiu uma importante posição de exportador de leite e derivados, uma virada comercial importante, que contribui com benefícios para diversos elos da cadeia produtiva, consolidando ainda a posição do país no mercado internacional de lácteos (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008). A indústria de laticínios é uma atividade de grande importância na economia mundial, sendo o Brasil o sétimo maior produtor. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2005 foram produzidos cerca de 24 bilhões de litros de leite, o que corresponde a um nível inferior ao encontrado nos países de produção altamente intensiva e mecanizada, como os EUA. A região Sudeste é responsável por 39% dessa produção, representada principalmente pelo Estado de Minas Gerais, que produziu cerca de 6,9 bilhões de litros no ano de 2005 (ALVES, 2008; BRUM; SANTOS JÚNIOR e BENEDETTI, 2009).

Dados de 2007 indicam que existe no Brasil, aproximadamente, 1,3 milhões de produtores de leite produzindo 26,4 bilhões de litros/ano, o que gerou nesse ano um valor bruto da produção de aproximadamente R$ 15 bilhões A produção leiteira no país é essencialmente atividade secundária da pecuária extensiva de corte. No Nordeste são produzidos 14% do leite do Brasil. Nessa região, na atividade pecuária, 90% são pequenas propriedades, possuem baixo uso de tecnologias

apropriadas, com agronegócio regional informal e mão-de-obra desqualificada. Mais do que seu peso econômico no abastecimento nacional, essa atividade assume papel social de extrema relevância, constituindo, muitas vezes, como a única perspectiva de sustentabilidade e inserção no mercado para pequenas propriedades de base familiar disseminadas no semi-árido nordestino (ALVES, 2008; SILVA, 2008).

Dos derivados lácteos, o queijo ainda tem um caráter acentuadamente manual. É um produto que demanda menos tecnologia e mais habilidade dos "mestres queijeiros" (ALVES, 2008). Nesta última década, no Brasil, os queijos produzidos tiveram um consumo recorde, continuando em ascensão (LIRA et al, 2009). A figura 3 demonstra o processo de fabricação do queijo, com a sequência de atividades envolvidas neste processo, desde o recebimento da matéria-prima até o produto acabado (BIEGER e RINALDI, 2009).

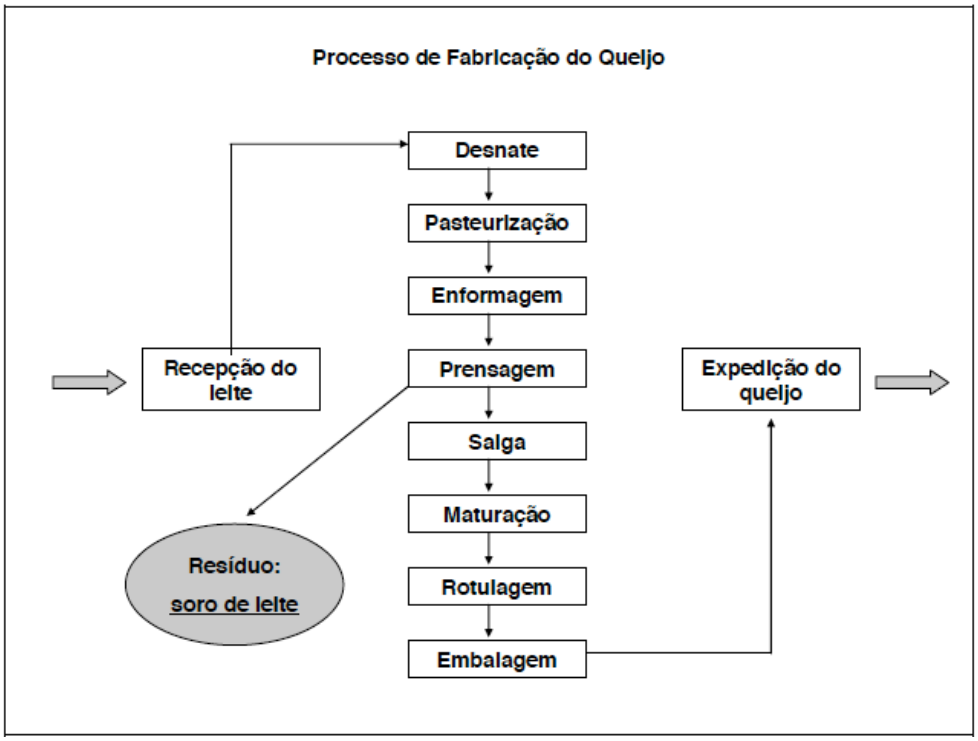

Figura 3 - Esquema do processo de fabricação do queijo.
Fonte: BIELGER e RINALDI, 2009.

1.3.4.1. A produção de queijo no Nordeste

A colonização brasileira, com suas peculiaridades, forjou, ao longo dos séculos, um desenho da situação agrária, especialmente no Nordeste, onde se

encontra a predominância do latifúndio da cana de açúcar no litoral e zona-da-mata, e nas áreas mais adentradas como o Agreste, o desenvolvimento de lavouras e de pecuária, principalmente em pequenas e médias propriedades. Dessa forma, observa-se que a atividade pecuária tornou-se forte e, até certo ponto, rentável, tendo como prova disso a existência de várias bacias leiteiras no Estado de Pernambuco (AMADOR, 2009).

O queijo é um dos mais antigos alimentos preparados que a história da humanidade registra. A arte da fabricação de queijos tem seu início perdido num passado muito remoto, milhares de anos antes do nascimento de Cristo. Em épocas pré-históricas, antes que o homem pudesse ler ou escrever, um legendário mercador viajante da Arábia, atravessando uma agreste região montanhosa da Ásia, depois de uma áspera subida, fez uma pausa para se alimentar e restaurar suas forças. Trazia como alimento tâmaras secas e certa quantidade de leite de cabra, dentro de um cantil feito de estômago seco de carneiro. Ao levar aos lábios o cantil para sorver o leite, apenas um líquido fino e aquoso escorreu do seu interior. Ao cortar o cantil, o viajante observou que o leite tinha se transformado numa coalhada branca, não muito desagradável ao paladar de um homem faminto. O coalho existente no estômago parcialmente seco do carneiro havia coagulado o leite, tendo assim, o queijo como resultado. Apesar do fato ter se passado há milhares de anos, ainda hoje se faz o queijo coagulando o leite com coalho obtido do estômago de bezerros. Os egípcios estão entre os primeiros povos que cuidaram do gado e tiveram, no leite e no queijo, uma fonte importante de sua alimentação (BARBOSA et al., 2010).

A atividade de produção artesanal de queijos (coalho e manteiga) e produtos lácteos (coalhada e manteiga em garrafa) na Região Nordeste é significativa para a economia regional, por se tratar de um produto de grande aceitação popular, representando também fonte de renda e de trabalho para parcela considerável de pequenos e médios produtores rurais. O queijo artesanal, em particular o queijo coalho, é um produto amplamente consumido pela população local e pelos turistas que visitam a Região. A fabricação destes queijos demanda grande volume de leite, envolvendo ainda uma parcela considerável de pequenos e médios produtores estabelecidos especialmente na zona rural, para os quais esta atividade econômica significa a principal fonte de renda e trabalho (CAVALCANTE, 2005).

No Brasil, existem vários tipos de queijos frescos produzidos de forma artesanal e industrial, tanto por pequenos produtores quanto por algumas indústrias. Esses queijos são muito populares e devido ao bom rendimento que proporcionam na fabricação, são comercializados a preços acessíveis à boa parte da população (FERREIRA e FILHO, 2008).

O Agreste de Pernambuco, região intermediária entre a Zona da Mata e o Sertão, é caracterizado por uma economia diversificada, com o cultivo de milho, feijão e mandioca, além da pecuária de leite e de corte. A região apresentou crescimento de 23% na produção leiteira dos últimos anos, representando 73% da produção leiteira do Estado de Pernambuco. Um exemplo de atividade econômica rentável no Estado é a produção artesanal de queijos, sendo bastante expressiva para a economia regional, sabendo-se que cerca de 30% do leite produzido no Estado é destinado a esta atividade, chegando em algumas micro-regiões a 40 a 50% (CAVALCANTE, 2005; MONTEIRO et. al., 2007).

Desprovida de sofisticação tecnológica, as queijarias do agreste nordestino inclui-se entre os poucos empreendimentos adequados para modificar o perfil social e econômico de pequenos municípios da Região. Geralmente, o que dificulta o alcance de um futuro concreto e promissor para essa atividade é uma organização cooperativa, um suporte de crédito oficial e programas de aperfeiçoamento técnico dos produtores artesãos. No entanto, o mais difícil já existe, que é a marca forte de uma tradição que sobrevive unicamente em razão de sua qualidade (CAVALCANTE, 2005).

1.3.5. Rejeitos industriais

Dentre os rejeitos industriais, destacam-se os resíduos, que podem ser definidos como a diferença no balanço de massa e energia nos processos de transformação de matérias-primas em produtos. Assim, podem os não estar previstos no processo de manufatura industrial, ser ou não gerados durante o processo, ser ou não utilizados como parte do produto final, bem como ser ou não utilizados como matérias-primas de outros processos (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001).

Um dos maiores problemas enfrentados pelo mundo industrializado é a contaminação do ar, solos, sedimentos, águas subterrâneas e superficiais por compostos orgânicos tóxicos, provenientes dos diversos tipos de produção industrial. Esse aumento dos problemas ligados à poluição ambiental tem causado uma maior conscientização no que diz respeito à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de poluentes e da necessidade de remediar os locais impactados (CERQUEIRA e COSTA, 2009).

Em geral, os efluentes industriais contêm nutrientes que podem estimular o crescimento desenfreado de plantas aquáticas, algas e cianobactérias, quando estes são lançados em lagos, açudes, rios, mares etc; causam o desequilíbrio desses corpos de água, além do que, podem apresentar composição extremamente tóxica, como os hidrocarbonetos encontrados em resíduos petroquímicos, têxteis, que são de difícil decomposição (PAZ, 2005).

A descarga de efluentes provenientes da agricultura e indústrias de alimentos constitui um dos principais problemas ambientais em todo o mundo. A globalização tem levado à construção de indústrias cada vez maiores, gerando uma descarga de grande volume de efluente no ambiente (COSTA, 2008). Milhões de toneladas de resíduos agroindustriais são produzidos pela população humana anualmente. Por exemplo, a América Latina produz aproximadamente 500 milhões de toneladas/ano, sendo o Brasil responsável por quase metade deste montante (TAMANINI e HAULY, 2004). Os resíduos provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros. Esses materiais, além de fonte de matéria orgânica, são também fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (COELHO et. al., 2001).

Resíduos lácteos são considerados abundantes em indústrias de laticínios. Esses resíduos contêm grande quantidade de matéria orgânica e a disposição dos efluentes pode causar séria poluição ambiental. A indústria láctea, assim como muitas outras agro-indústrias, geram resíduos, entre eles o efluente de soro de leite produzido, com uma carga orgânica extremamente elevada (NAJAFPOUR et al., 2010).

Normalmente, os resíduos de indústrias de alimentos não causam nenhum risco e são biodegradáveis, porém a quantidade gerada e seu alto teor de matéria orgânica podem levar a sérios problemas ambientais caso não recebam nenhum tipo

de tratamento antes da disposição nos corpos receptores (COSTA, 2008). A utilização adequada destes resíduos ajuda a minimizar problemas ambientais e energéticos, podendo gerar produtos com aplicações relevantes da indústria farmacêutica e de alimentos (TAMANINI e HAULY, 2004).

Resíduos líquidos gerados pela indústria química e de alimentos apresentam uma grande complexidade física e química, dificultando seu tratamento e podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados, na maioria das vezes, sem nenhum tratamento prévio. Nesse sentido, a elevada potencialidade do uso de microrganismos como agentes biodegradadores das mais diversas substâncias produzidas, aliada ao emprego da biotecnologia, indicam o tratamento biológico como um dos mais eficientes métodos para a redução dos efeitos adversos desses contaminantes sobre o meio ambiente. Assim, os sistemas biológicos são utilizados para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental por meio da degradação dos poluentes, tendo se destacado por ser um método menos agressor e mais econômico (CERQUEIRA e COSTA, 2009).

Os microrganismos utilizam a matéria orgânica que constitui um resíduo, servindo-se de boa parte desta para sua autoconstrução e reprodução. O restante é oxidado por meio da respiração, aproveitando sua energia e compensando o meio com subprodutos do seu metabolismo. Assim, carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos, constituintes das moléculas orgânicas dos resíduos, são devolvidos ao meio (ar, água, solo), na forma de compostos mais simples, como gás carbônico, fosfatos e nitratos (LOPES; SCHEMBERGER; TRINDADE, 2008).

A proteção do meio ambiente contra agentes poluidores de origem industrial é um problema complexo para os países em desenvolvimento. A princípio, é necessário caracterizar as diferentes formas de contaminação do meio ambiente causada pela atividade industrial, sem limitar o desenvolvimento socioeconômico de um país e, ao mesmo tempo, mantendo o equilíbrio ambiental (PAZ, 2005). A preocupação com a preservação do meio ambiente encontra-se em destaque, com o aquecimento global, os transgênicos, a busca por combustíveis menos poluentes e mais ecologicamente equilibrados são alguns dos temas de discussões nacionais e internacionais (PENNA e CANOLA, 2009). De forma especial, a poluição das águas tornou-se assunto de interesse público em todas as partes do mundo, de modo que não apenas os países desenvolvidos são afetados pelos problemas ambientais,

sendo as nações em desenvolvimento também atingidas pelos graves impactos da poluição (BRIÃO e TAVARES, 2007).

1.3.5.1. Soro de leite

A fabricação de queijo é um método de transformação de componentes de leite em um produto de fácil conservação, menor volume, alto valor nutritivo, sabor agradável e boa digestibilidade. Neste processo, não há conversão de 100% do leite em queijo, sendo o rendimento variável entre 8,5% e 20% em função da consistência do queijo, produzindo assim, além do queijo, o soro de leite (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001).

Na Idade Média, o soro era utilizado em drogas farmacêuticas como componente de unguentos para queimaduras, como bálsamo para pele ou como neutralizante para cabelos, mas, raramente era empregado na alimentação humana. Em meados do século XIX, na Europa Ocidental, o uso do soro teve grande evidência com a criação de mais de 400 “casas de soro”. Nos anos 40, na Europa Central, foi usado no tratamento de dispepsia, uremia, gora, anemia, artrite, doenças hepáticas e até tuberculose, quando era recomendada a ingestão de cerca de 1.500 $g.dia^{-1}$ de soro (COSTA, 2008).

O soro de leite é obtido através do processamento do queijo, no qual a caseína é insolubilizada no seu ponto isoelétrico pela ação da renina, sendo o líquido restante chamado de soro doce. Se for resultado de precipitação ácida, é chamado de soro ácido. A composição do soro varia conforme o processo pelo qual é obtido. O soro do leite de vaca é um líquido que contém de 4 a 6 g de proteínas por litro (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008). Aproximadamente 80% do volume do leite destinado à fabricação de queijos correspondem ao soro gerado (LADEIRA et al., 2010). Mundialmente, a produção anual de soro de leite é estimada em 115 milhões de toneladas; aproximadamente 47% da produção é descartada no meio ambiente (NAJAFPOUR et al., 2010; KAVACIK e TOPALOGLU, 2010). No Brasil, essa produção é de 1.000.000t/ano, resultando em 7.500 t de proteínas de soro de queijo (LADEIRA et al., 2010).

O Brasil descarta grande parte do soro de queijo produzido na natureza, sem nenhum tipo de tratamento. O descarte desse subproduto no meio ambiente

representa uma significativa perda de recursos, causando sérios problemas de poluição. Além do sério problema ambiental, o não-aproveitamento do soro no Brasil coloca esse produto como o segundo derivado lácteo mais importado, perdendo apenas para o leite em pó. Em 2006, o Brasil importou mais de 30 mil toneladas de soro em pó, o que corresponde a um valor acima de 35,5 milhões de dólares (COSTA, 2008; KAVACIK e TOPALOGLU, 2010).

O soro de queijo é um subproduto de importância relevante, tendo em vista o volume produzido e sua composição nutricional. A fabricação de 1kg de queijo necessita, em média, de 10L de leite e fornece 9L de soro. O soro contém em sua composição 6,9% de sólidos totais, 0,6% de sais minerais, 0,3% de gordura, 0,9% de proteínas, 5,0% de lactose e 0,1% de ácido láctico, resultante da fermentação da lactose. Isso significa que o descarte desse rejeito sem um tratamento eficiente não é só um crime previsto por lei, mas é também rejeitar um alimento possuidor de alto valor nutricional (BARBOSA et. al., 2010). As proteínas do soro de leite têm alto valor biológico, superior ao de outras proteínas, como as encontradas no ovo, na soja e na caseína do leite, principalmente devido ao alto teor de aminoácidos essenciais de cadeia ramificada (isoleucina, leucina e valina) (PESCUMA et. al., 2010). A composição do soro de leite depende de uma série de parâmetros, como a composição e a qualidade do leite avaliadas, as técnicas de produção do queijo, a quantidade de fermento ou ácido usada na coagulação e sua qualidade, o período de coagulação e a temperatura (KAVACIK e TOPALOGLU, 2010).

Tabela 2 - Composição do soro de queijo doce e ácido.

Componentes	Soro Doce (%)	Soró Ácido (%)
Água	93-94	94-95
Sólidos totais	6-7	5-6
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Proteína (N x 6,38)	0,8-1,0	0,6-1,0
Nitrogênio não-protéico (% do N Total)	22	27
Ácido lático	0,1-0,2	0,7-0,8
Cinzas	0,5-0,7	0,7-0,8

Fonte: COSTA, 2008.

Durante muito tempo, o soro de leite foi utilizado na alimentação animal ou descartado em corpos d`água, provocando a destruição da flora e da fauna devido à sua elevada DBO, demanda bioquímica de oxigênio, que é cerca de 30.000 a 50.000 $mg.L^{-1}$. Este índice é aproximadamente 100 vezes superior ao de um esgoto doméstico. Considerando uma produção média de 10.000L de soro por dia, este teria o poder poluente equivalente ao de uma população de 5.000 habitantes (LIRA, et. al., 2009). No Brasil, uma das principais opções de aproveitamento do soro de leite, e também as mais comercializadas, são as bebidas fermentadas, com características sensoriais semelhantes ao iogurte, e bebidas lácteas não-fermentadas (CAPITANI et. al., 2005).

O reuso e o reciclo de efluentes de laticínios surge como uma alternativa para a minimização do lançamento destes, evitando a sobrecarga nos sistemas de tratamento e servindo como uma ferramenta na redução de custos (BRUM; SANTOS JÚNIOR e BENEDETTI, 2009). Uma vez que o soro de leite contém naturalmente lactose e material orgânico biodegradável, o tratamento biológico é um processo prático, a ser usado no seu reaproveitamento. Entre os processos de tratamento biológico, tratamento em lagoas, ativação de sistemas de lodo e tratamento anaeróbico são comumente empregados para o tratamento efluente lácteo. O soro é inicialmente hidrolisado e convertido a ácidos orgânicos por microrganismos acidogênicos, quando a degradação é seguida por bactérias metanogênicas e *Methanosarcina* (NAJAFPOUR et al., 2010).

Em fábricas de queijo, a recuperação completa de subprodutos de soro de leite pode não ser possível. O soro pode conter valioso substrato para bioconversão. Mais de 90% da DBO total do soro de leite é representada por lactose, lactato, proteínas e gordura (NAJAPFOUR et. al., 2010). Cada vez mais a legislação ambiental exige das indústrias de laticínios um plano de tratamento ou reaproveitamento deste soro (LIRA et. al., 2009). Assim, as indústrias de laticínios procuram alternativas para o tratamento desse soro e entre elas está o seu aproveitamento como substrato para fermentação, sendo também matéria-prima bastante interessante na fabricação de vários produtos (BARBOSA et al., 2010). Particularmente, para fábricas de queijo de médio porte, que tem crescentes problemas de eliminação e não podem dispor de altos custos de investimento para

valorização de tecnologias utilizando o soro de leite, é imprescindível o tratamento físico-químico e/ou biológico para esse efluente (KAVACIK e TOPALOGLU, 2010).

Sendo dispendioso o tratamento de efluentes e sendo o soro de leite rico em diversos nutrientes, pode ter sua utilização direta estimulada ou seus componentes aplicados em várias formulações de alimentos, como bebidas lácteas, leites fermentados, sucos, ricota, bebidas nutricionais fortificadas, entre outras (LIRA et al., 2009). É reaproveitado na elaboração de bebidas lácteas, como uma forma racional de aproveitamento, por apresentar excelente valor nutritivo e fornecer alta qualidade proteica com baixo teor de gordura e lactose (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008). Devido ao alto teor orgânico do soro de leite, processos de digestão anaeróbica também são recomendados para o seu reaproveitamento, sendo esta uma excelente solução em termos de economia de energia como de controle da poluição (NAJAFPOUR et al., 2010).

As proteínas solúveis do soro de leite possuem alto valor biológico, melhorando o desempenho muscular, podendo exercer papel importante na saúde humana, como agente redutor do risco cardíaco (HARAGUCHI, ABREU e DE PAULA, 2006). O soro de leite vem sendo ainda estudado, como alternativa promissora, em bioprocessos, para a obtenção da goma xantana, provavelmente o biopolímero mais utilizado nos últimos anos (NERY et. al., 2008). Oliveira et. al. (2008) observou que a aplicação do soro de leite como revestimento comestível em morangos, especialmente na concentração de 100%, reduz a incidência de bolores e leveduras quando combinada com armazenamento a 10°C.

De acordo com a tecnologia envolvida e do tipo de queijo produzido, o soro pode representar entre 80 e 95% do volume do leite utilizado no processo, apresentando 55% dos nutrientes originais deste. Assim, alternativas tecnológicas para o seu adequado aproveitamento são fundamentais. Estima-se que aproximadamente 50% de todo o soro de leite produzido não é aproveitado, sendo este número ainda maior se forem levadas em consideração as micro e pequenas empresas (LIRA et. al., 2009). A economia gerada pela diminuição dos descartes da indústria de laticínios, principalmente as de pequeno e médio porte, através da utilização do soro de leite para a formulação de outros produtos, é motivo suficiente para incentivar o aproveitamento desse subproduto (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008).

O soro de leite visto como um rejeito e não como uma matéria-prima dificulta muito o aproveitamento deste valioso produto. O aproveitamento deste encontra alguns obstáculos. Um deles é o fato de que a maioria das queijarias é de pequeno e médio porte, o que dificulta a implantação de uma política de aproveitamento ou tratamento. A falta de recursos humanos qualificados na maioria das unidades produtivas e a deficiente malha viária e grandes distâncias que dificultam o escoamento desse produto também fazem parte das dificuldades encontradas (ANDRADE, 2005).

REFERÊNCIAS

ALVES, A. E. S. Indústria de laticínios: organização do trabalho e qualificação. **Publ. UEPG Ci. Hum., Ci. Soc. Apl., Ling., Letras e Artes**, Ponta Grossa, 16 (2): 277-287, dez. 2008.

AL-JANABI, A. A. H. S. Identification of bacitracin produced by local isolated of *Bacillus licheniformis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5 (18), p. 1600-1601, 2006.

AMADOR, M. B. M. Pequena produção/Pequena pecuária: uma abordagem sistêmica. **Campo território: revista de geografia agrária**, v. 4, n. 7, p. 167-184, 2009.

ANDRADE, Ailton Cesar. **Estudo da fermentação simultânea à hidrólise, de soro de queijo, utilizando lactase e *Saccharomyces cerevisiae***. 2005. 110f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ANGONESE, M. T. et. al., Efeito fungistático de *Bacillus spp*. sobre fungos fitopatogênicos. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.

ASLIM, B.; SAGLAM, N.; BEYATLI, Y. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. **Turk. J. Biol**., 26:41-48, 2002.

AWAIS M. et. al., Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus sp*. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, 39(4): 1303-1312, 2007.

BARBOSA et. al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 07-25, Mossoró, 2010.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: **47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Administração e Sociologia Rural**, Porto Alegre, 26 a 30 de julho de 2009.

BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Ultrafiltração como processo de tratamento para o reuso de efluentes de laticínios. **Eng. Sanit. Ambient**., v. 12, n. 2, p. 134-138, abr/jun, 2007.

BRUM, L. F. W.; SANTOS JÚNIOR, L. C. O.; BENEDETTI, S. Reaproveitamento de água de processo e resíduos da indústria de laticínios. In: **INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION**, São Paulo, Brazil, 2009.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-506, 2000.

CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin**., 27(1):44-52, 2009.

CAPITANI, C. D. et. al. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1123-1128, 2005.

CARVALHO et al. Growth, Sporulation and Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Vol.53, n. 3: pp. 643-652, mai/jun, 2010.

CAVALCANTE, José Fernando Mourão. **Sistema de apoio à decisão na produção de leite e queijo coalho com segurança alimentar**. 2005. 182 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

CERQUEIRA, V. S.; COSTA, J. A. V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, 394-400, 2009.

CLERCK, E. D.; VOS, P. D. Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources. **FEMS Microbiology Letters**, 231: 91-98, 2004.

COELHO, M. A. Z. et. al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **B. CEPPA**, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

COSTA, M. R.; JIMÉNEZ-FLORES, R.; GIGANTE, M. L. Propriedades da membrana do glóbulo de gordura do leite. **Alim. Nutr**., v. 20, n. 3, p. 507-514, jul./set., 2009.

COSTA, Amália Michelle Costa. **Desempenho de filtro anaeróbio no tratamento de efluente formulado com diferentes concentrações de soro de queijo**. 2008. 93f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2008.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolismo. **Internatl. Microbiol**., 1:259-264, 1998.

DEREJE, K. G. The potential of biotechnology inEthiopia: present situation an expected development. **Food and chemical Toxicology**, 49:685-689, 2011.

DIAS, W. A. Biotecnologia e biodiversidade no bioma cerrado: incursões reflexivas. **Ateliê Geográfico**, Goiania, v. 1, n. 9, p. 224-239, 2010.

DIAS, D. R. et. al. Alkaline protease from *Bacillus sp*. isolated from coffee bean grown on cheese whey. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24: 2027-2034, 2008.

DYK, J. S. et al. Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. **Enzyme and Microbial Technology**, 2010.

DONG, W. et. al. Optimization of the growth culture medium with traditional Chinese herbs and conditions of *Bacillus licheniformis* SH003. In: 4th **International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering**, Chengdu, China, 18-29/Jun 2010.

DUBIN, A. et. al. New generation of peptide antibiotics. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 633-638, 2005.

EL-BENDARY, M. A.; MOHARAM, M. E.; FODA, M. S. Efficient mosquitocidal toxin production by *Bacillus sphaericus* using cheese whey permeate under both submerged and solid state fermentations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 46-53, 2008.

EL-SERSY, N. A.; EBRAHIM, H. A. H.; ABOU-ELELA, G. M. Response surface methodology as a tool for optimizing the production of antimicrobial agents from *Bacillus licheniformis* SN2. **Current Research in Bacteriology**, 2009.

EPPERSON, J. D.; MING, L. Proton NMR studies of Co(II) complexes of the peptide antibiotic bacitracin and analogues: insights into structure – activity relationship. **Biochemistry**, v. 39, p. 4037-4045, 2000.

FARZANA, K. et. al. Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 55-57, 2005.

FARZANA, K. et. al. Biosynthesis of bacitracin in stirred fermenter by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. **Journal of Research (Science)**, v. 15, n. 3, p. 285-290, 2004.

FERREIRA, W. L.; FILHO, J. R. F. Avaliação da qualidade físico-química do queijo coalho comercializado no município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 02, n. 01, p: 127-133, 2008.

GHALY, A. E. et. al. Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures. **American Journal of Biotechnology and Biochemistry**, 3 (2): 47-54, 2007.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, 2001.

GOVAERTS, C. et. al., Hyphenation of liquid chromatography to ion trap mass spectrometry to identify minor components in polypeptide antibiotics. **Anal. Bioanal. Chem**., 377:909-921, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, Vol. 33, N. 3, 667-679, 2010.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr**., Campinas, 19(4): 479-488, 2006.

HASAN et. al. Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, 41(3): 1499-1510, 2009.

INJAC et. al., Densitrometic determination of zinc bacitracin and nystatin in animal feed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88:1576-1581, 2008.

ISHIHARA et. al. Distribution and variation of bacitracin synthetase gene sequences in laboratory stock strains of *Bacillus licheniformis*. **Current Microbiology**, vol. 45, pp. 18-23, 2002.

JAMIL, B. et. al. Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. **Pak. J. Pharm. Sci**., v. 20 (1):26-31, 2007.

KALIMUTHU, K. et. al. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, 65: 150-153, 2008.

KAVACIK, B.; TOPALOGLU, B. Biogas production from co-digestion of a mixture of cheese whey and dairy manure. **Biomass and bioenergy**, 34: 1321-1329, 2010.

KAYALVIZHI, N.; GUNASEKAN, P. Purification and characterization of a novel broad-spectrum bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 15:365-370, 2010.

KOLLER, M. et. al. A viable antibiotic strategy against microbial contamination in biotechnological production of polyhydroxyalkanoates from surplus whey. **Biomass and Bioenergy**, 35:748-753, 2011.

KUTA, F. A., NIMZING, L., ORKA`A, P. Y. Screening of *Bacillus* species with potentials of antibiotics production. **Applied Medical Informatics**, Cluj-Napoca, vol. 24, N. 1-2, pp. 42-46, 2009.

LADEIRA, et. al. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Quim. Nova**, vol. X-Y, n. 00, 1-5, 2010.

LIANG, W. et. al., A 70-kDa molecular chaperone, DnaK, from the industrial bacterium *Bacillus licheniformis*: gene cloning, purification and molecular characterization of the recombinant protein. **Indian J. Microbiol**. 49:151-160, 2009.

LIRA et. al., Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29 (1): 33-37, jan.-mar., 2009.

LOPES, C. B.; SCHEMBERGER, A.; TRINDADE, J. L. F. Biotecnologia e bioconversão de resíduos agro-industriais – uma revisão. In: **VI Semana de Tecnologia em Alimentos**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Paraná. ISSN: 1981-366X, v. 2, n. 25, 2008.

MANNANOV, R. N.; SATTAROVA, R. K. Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 37, n. 2, 2001.

MATOS et. al., Study on the dissemination of the *bcrABDR* cluster in *Enterococcus* spp. reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 34, 142-147, 2009.

MONTEIRO, A. A. et. al. Características da produção leiteira da região do agreste do Estado de Pernambuco. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 665-674, out./dez. 2007.

MONTEIRO, C. et. al. Utilização de antibióticos numa amostra da população de Lisboa. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, (7) 1: 21-35, 2010.

MURPHY, T. et. al. Elicitation effects of oligosaccharides on the transcriptional level of bacitracin ABC transporter genes in *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Lett**., 30: 1665-1670, 2008.

NAJAFPOUR, G. D. et al. Bioconversion of cheese whey to methane in na upflow anaerobic packed bed bioreactor. **Chem. Biochem. Eng. Q**., 24 (1):111-117, 2010.

NERY, T. B. R. et. al. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Quim. Nova**, v. 31, n. 8, 1937-1941, 2008.

NIKEREL, L. E.; ATES, O.; ONER, E. T. Effect of bioprocess conditions on growth and alkaline protease production by halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Vol. 44, n. 5, pp. 539-544, 2008.

NIMPIBOON, P. et. al. Synthesis of a novel prebiotic trisaccharide by a type I α-glucosidase from *Bacillus licheniformis* strain TH4-2. **Process Biochemistry**, 46:448-457, 2011.

NIU, D. et. al. High yield recombinant thermostable α-amilase production using an improved *Bacillus licheniformis* system. **Microbial Cell Factories**, 8:58, 2009.

OLANO, C. et. al. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, 10:281-292, 2008.

OLIVEIRA, C. M. et. al. Utilização do soro de leite bovino como revestimento protetor em morangos. **B. CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 2, p. 187-196, 2008.

OLIVERA, Florencia Cladera. **Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis* P40**. 2004. 134f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PALLADINO, Fernanda. **Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

PAZ, Mabel Calina de França. **Identificação e caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*. Produção de biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (DBT) por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986**. 2005. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro de leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Braz. J. Food Technol**, Campinas, VII BMCFB, dez. 2008.

PENNA, J. B.; CANOLA, B. C. A evolução da biotecnologia e da engenharia genética frente às implicações ambientais, ao biodireito e aos direitos fundamentais. **R. Fac. Dir. UFG**, V. 33, n. 2, p. 74-88, jul./dez. 2009.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture, **Current Opinion in Biotechnology**, 22:1-7, 2011.

PESCUMA, M. et. al. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 141: 73-81, 2010.

QI, Z. et. al. Characterization of the mechanism of the *Staphylococcus aureus* cell envelope by bacitracin and bacitracin-metal ions. **J. Membrane Biol**., 225: 27-37, 2008.

REGINATO, E.; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 81-86, 2009.

SCHEIDL et. al. Simultaneous quantification of neomycin and bacitracin by LC-ELSD. **Chromatographia**, 2009.

SILVA, Dinara Leslye Macedo. **Fatores que afetam a competitividade do queijo artesanal: um estudo exploratório na região do Seridó/RN**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**, Ed. Guanabara Koogan, 7ª edição, p. 933 e 1006, Rio de Janeiro, 2006.

SIN, D. W.; WONG, Y. Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 11, 2003.

SOROKULOVA, I. B. et. al. The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. **Dig. Dis. Sci**., 53: 954-963, 2008.

TAMANINI, C., HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TANNLER, S.; DECASPER, S.; SAUER, U. Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. **Microbial Cell Factories**, 7:19, 2008.

TEIXEIRA, Mário Lettieri. **Purificação e caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis***. 2007. 80f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

TODOROVA, S.; KOZHUHAROVA, L. Characteristics and antimicrobial activity of Bacillus subtilis strains isolated from soil. World J. Microbiol. Biotechnol., 26:1207-1216, 2010.

VÁSQUEZ, S. F. Possíveis impactos da Biotecnologia no meio ambiente, especialmente na população humana. **Revista Biociências**, UNITAU, v. 14, n. 1, 2008.

VEITH, B. et. al. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 7:204-211, 2004.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE BACITRACINA POR *Bacillus licheniformis* (UCP1010) EM SORO DE LEITE EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista Brazilian Arquives and Biology anda Technology.

PRODUÇÃO DE BACITRACINA POR *Bacillus licheniformis* (UCP1010) EM SORO DE LEITE EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

Amanda de Araújo Alencar; Amanda Mota Vieira; Kaoru Okada; Carlos Alberto Alves da Silva

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais/Universidade Católica de Pernambuco
Rua do Príncipe, 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife/PE

ABSTRACT

This work aimed to study the biotechnological potential of Bacillus licheniformis (UCP1010) for production of bacitracin using whey as substrate. For antibiotic production, was used the standard production medium, replacing the glutamic acid by the whey, with glucose as additional carbon source. The influence of varying temperature, glucose and whey was measured using a 2^3 factorial design. The production was detected by disk diffusion test, using Micrococcus flavus as microorganism test. According to the results, the best production occurred at 37°C, at alkaline pH, after 72h of growth, with halos of 27mm in diameter, indicating that tests based on the conditions of the central point showed best potential for production of bacitracin. Thus, the whey concentration of 40% (v/v) and 20g/L of glucose were more efficient for the production of the antibiotic.

Keywords: *antibiotics, glucose, industrial wastes.*

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Bacillus* são gram-positivas aeróbias ou anaeróbias facultativas, esporuladas em forma de bastão. Possuem habilidades fisiológicas que permitem o seu crescimento em vários ambientes, competindo favoravelmente com outras bactérias, devido à formação de esporos estáveis ao calor, à radiação e com efeito antagonista sobre outros microrganismos (KUTA, NIMZING e ORKA`A, 2009).

Bacillus licheniformis é uma bactéria encontrada na maioria dos solos, principalmente em solos pobres em nutrientes, como pântanos e desertos. É comum também em alimentos, incluindo produtos naturais agrícolas, como cereais. É uma espécie comumente utilizada na indústria biotecnológica para produção de vários bioprodutos, dentre eles: enzimas, inseticidas, surfactantes e antibióticos peptídicos (BOER, PRIEST e DIDERICHSEN, 1994; CLERCK e VOS, 2004; REY et. al., 2004; BHUNIA, DUTTA e CHAUDHURI, 2010; DONG et. al., 2010; SONGSIRIRITTHIGUL et. al., 2010ç LIU et. al., 2011).

Bacitracina é um antibiótico polipeptídico produzido por espécies de *B. licheniformis* e *Bacillus subtilis*, comumente usada contra microrganismos gram-positivos (INJAC et. al., 2008). É um dodecapeptídeo metal-dependente (QI et. al., 2008), consistindo de grupos peptídicos intimamente relacionados, sendo a bacitracina A o principal componente químico do complexo antibiótico

(ISHIHARA et. al., 2002). Em adição, bacitracina de zinco, junto com sulfato de neomicina e polimixina, são os ingredientes comuns na formulação de pomadas para o tratamento de infecções oftalmológicas e queimaduras leves (SIN e WONG, 2003). Além disso, é amplamente utilizada como suplemento alimentar animal, para melhorar o peso corporal do animal e ainda prevenir doenças. Dessa forma, a bacitracina é importante para as indústrias farmacêutica e pecuária em todo o mundo (QI et. al., 2008). Atua como um inibidor da síntese da parede celular, apesar de também poder interferir em outros processos celulares (MATOS et. al., 2009).

Milhões de toneladas de resíduos agroindustriais são produzidos pela população humana anualmente, sendo o Brasil responsável por quase metade do montante de resíduos produzido na América Latina. Normalmente, os resíduos de indústrias de alimentos não causam nenhum risco ambiental e são biodegradáveis, porém a quantidade gerada e seu alto teor de matéria orgânica podem ocasionar sérios problemas ambientais caso não recebam nenhum tipo de tratamento antes da disposição nos corpos receptores. A utilização adequada destes resíduos possibilitará a minimização dos problemas ambientais e energéticos, podendo gerar produtos com aplicações relevantes para a indústria farmacêutica e de alimentos (TAMANINI e HAULY, 2004; COSTA, 2008).

O soro de leite é definido como subproduto da fabricação de queijo, sendo considerado um resíduo de baixo ou nenhum valor comercial, na maioria das vezes utilizado na alimentação de animais ou descartado em efluentes sem qualquer tratamento prévio (BIASUTTI, 2006; PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008; LIRA et. al., 2009). Diversos países desenvolvem pesquisas visando obter opções para a utilização do soro de leite, evitando que funcione como agente de poluição ambiental (ALMEIDA, BONASSI E ROÇA, 2001). No Brasil, as indústrias produtoras de queijo em geral são de pequeno porte, não possuindo meios econômicos ou tecnologia disponível para o reaproveitamento do soro (CORDI et. al., 2007). Assim, esse rejeito pode ser considerado um poluente extremamente problemático, devido à sua elevada carga orgânica e grande volume gerado, devendo ser tratado antes do seu descarte (NITSCHKE, RODRIGUES e SCHINATTO, 2001; CORDI et. al., 2007; BIASUTTI et. al., 2008).

No presente trabalho foi estudado o potencial biotecnológico de *B. licheniformis* isolado de solo contaminado por petróleo, para produção de bacitracina utilizando o soro de leite, rejeito oriundo da fabricação do queijo, através da formulação de meios alternativos e de baixo custo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos

Foi utilizada cultura de *B. licheniformis* (UCP1010), isolada de solo contaminado por petróleo no porto da cidade do Recife e catalogada na Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, registrada no World Federation Culture

for Collection (WFCC). A linhagem do *Micrococcus flavus* (UFPEDA323), utilizada como microrganismo teste para avaliar a produção de bacitracina, foi cedida pelo Banco de Culturas do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. As culturas foram mantidas em meio Ágar Nutritivo (AN), contendo ($g.L^{-1}$): peptona (10g), extrato de carne (3,0g), NaCl (5,0g), Ágar (20g), água destilada q.s.p. 1000mL, pH 7,0.

Substrato

O soro de leite utilizado foi obtido previamente em indústrias de laticínios do Agreste de Pernambuco, cujo pH inicial foi de 6,1. O soro foi imediatamente congelado após recebimento, em volumes de 500mL, e mantido a 5°C, para ser utilizado durante o trabalho.

Pré-inóculo

A amostra de *B. licheniformis*, após mantida em meio Ágar Nutritivo durante 24h, foi transferida para 250mL de caldo nutritivo, em Erlenmeyers (500mL de capacidade). O pré-inóculo foi realizado sob agitação de 150rpm por 16h. Posteriormente, foram retirados 25mL do pré-inóculo, transferidos para frascos Erlenmeyers de 500mL, contendo 250mL dos meio alternativos.

Planejamento fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com 4 repetições do ponto central, totalizando 12 experimentos, tendo como variável resposta o diâmetro do halo de inibição no melhor tempo de produção. As variáveis analisadas foram: temperatura, concentração de glicose e concentração de soro de leite, conforme a tabela 1. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 1 – Matriz do planejamento fatorial 2^3.

Variáveis	Unidades	Níveis		
		-1	0	+1
Glicose	g/L	0	20	40
Soro de leite	% v/v	10	40	70
Temperatura	°C	28	37	46

Produção da bacitracina

A produção de bacitracina foi realizada em meio proposto por Hendlin (1949), contendo ($g.L^{-1}$): L-ácido glutâmico (10g), K_2HPO_4 (0,5g), KH_2PO_4 (0,5g), $MgSO_4.7H_2O$ (0,2g), $MnSO_4.7H_2O$ (0,01g),

$FeSO_4.7H_2O$ (0,01g), água destilada q.s.p. 1000mL. O meio foi modificado através da substituição do ácido glutâmico pelo soro de leite e utilização de glicose como fonte adicional de carbono. O pH inicial foi ajustado para 7,0. De acordo com Farzana et. al. (2004), K_2HPO_4 e KH_2PO_4 são empregados como agentes tampão, $MnSO_4.7H_2O$ e $MgSO_4.4H_2O$ como co-fatores das enzimas e $FeSO_4.7H_2O$ é utilizado para auxiliar a ação dos íons manganês.

Após preparados, os meios foram autoclavados a 121°C, durante 15 minutos. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers (capacidade de 500 mL), contendo 250 mL do meio alternativo, utilizando-se 10% desse volume (25 mL) do pré-inóculo. Os ensaios foram incubados sob agitação orbital de 150rpm, por 96 horas, a temperaturas de 28°C, 37°C e 46°C. Amostras foram coletadas a cada 4 horas, durante todo o processo de fermentação e submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro (600nm) e o pH foi determinado através de potenciometria.

Determinação da atividade antibiótica pelo método de difusão em disco

A determinação da atividade antibiótica foi realizada pelo método de difusão em disco (MOTTA e BRANDELLI, 2002). Placas de Petri contendo 10 mL do meio Ágar Nutritivo foram semeados por espalhamento superficial com suspensões (escala 0,5 de MacFarland) contendo o microrganismo teste *M. flavus* (UFPEDA 323). Em seguida foram utilizados discos de papel xarope, previamente esterilizados, medindo 8 mm de diâmetro, embebidos nas amostras contendo líquido metabólico, coletadas durante o processo fermentativo. As amostras das respectivas fermentações de *B. licheniformis* foram filtradas em membranas com poros de 0,22µm da marca Millipore e depositados na superfície do Ágar. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37ºC. O aparecimento de um halo de inibição ao redor dos discos indica a presença de atividade antibiótica, sendo o diâmetro medido e expresso em milímetros.

Determinação do consumo de glicose

Para a determinação da concentração de glicose, utilizou-se um kit comercial da Labtest, cuja metodologia baseia-se no método enzimático-colorimétrico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505nm.

Análises estatísticas

As análises estatísticas da produção da bacitracina foram realizadas utilizando o Software Statistica versão 9.0 da Stat Soft.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência da temperatura, do pH e do consumo de glicose no crescimento de *B. licheniformis* para produção de bacitracina

O microrganismo utilizado apresentou comportamentos diferentes de acordo com as variáveis utilizadas durante o processo. Em todas as temperaturas, foi observada a produção de bacitracina, sendo o melhor resultado observado nos ensaios do ponto central. A matriz do planejamento decodificada e os resultados da variável resposta diâmetro do halo de inibição são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Matriz decodificada dos ensaios realizados e variável resposta do planejamento fatorial 2^3 para produção de bacitracina por *B. licheniformis*.

Ensaios	Variáveis independentes			VARIÁVEL RESPOSTA
	Glicose	Soro de leite	Temperatura	Diâmetro do halo de inibição após 72h (mm)
1	-1	-1	-1	11
2	+1	-1	-1	14
3	-1	+1	-1	0
4	+1	+1	-1	0
5	-1	-1	+1	0
6	+1	-1	+1	19
7	-1	+1	+1	12
8	+1	+1	+1	0
9	0	0	0	27
10	0	0	0	23
11	0	0	0	27
12	0	0	0	21

Nos ensaios em que houve melhor produção, esta teve início após 24h do crescimento microbiano, tendo sido obtida a melhor atividade antibiótica após 72h, a 37°C, em pH 6,48. Com o aumento do período de fermentação, a produção da bacitracina foi reduzida, o que pode ser atribuído à inibição da enzima "bacitracina sintetase" como mecanismo de *feedback* (FARZANA et. al., 2005). A avaliação do consumo de glicose nos melhores ensaios indicou que o maior consumo ocorreu durante as primeiras 32h do processo fermentativo, período em que ocorrem a fase exponencial e início da fase estacionária do crescimento. O crescimento de *B. licheniformis*, a variação de pH e o consumo de glicose podem ser observados na figura 1.

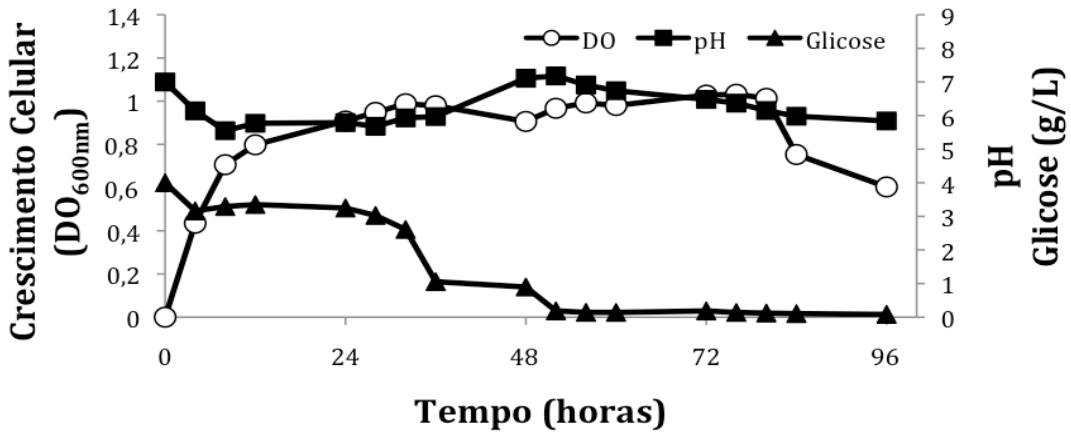

Figura 1 – Curva de crescimento celular, variação do pH e consumo de glicose no decorrer do processo fermentativo em ensaio com maior produção de bacitracina por *B. licheniformis*.

Observou-se que a máxima produção da bacitracina ocorreu na fase estacionária do crescimento, fase em que são produzidos os metabólitos secundários, dentre ele os antimicrobianos peptídicos (KHALIL et. al., 2009). A produção do antimicrobiano não foi observada durante a fase exponencial, o que confirma que os microrganismos crescem rapidamente quando os nutrientes são abundantes, mas a produção de antibióticos geralmente ocorre após ter cessado o crescimento (CARVALHO et. al., 2010).

Quanto ao melhor tempo de produção, os resultados obtidos corroboram com Kaleem, Iqbal e Jamil (2000) que, produzindo agentes antimicrobianos por *B. subtilis* utilizando melaço como substrato, obtiveram máxima eficiência após 72h de crescimento, tendo sido adicionado ao meio uma tripla combinação dos sais $MgSO_4.7H_2O$, $CuSO_4.7H_2O$ e KH_2PO_4. De forma semelhante, Hasan et. al. (2009) ao otimizarem a produção de antibióticos por *B. pumilus* imobilizado em gel de poliacrilamida, observaram maior halo de inibição após 72h de incubação.

Usualmente, a bacitracina é produzida comercialmente a 37°C e a temperatura é um fator importante na produção dos antibióticos por interferir no crescimento e na velocidade dos processos enzimáticos dos microrganismos (HADDAR et. al. 2007). Awais et. al. (2007) obtiveram bacitracina de *B. subtilis* a 30°C, usando meio sintético, acrescido de glicose na concentração de 50g/L, após 24h de crescimento. Olivera, Caron e Brandelli (2004), analisando a produção de bacteriocina por *B. licheniformis* em soro de leite na concentração de 70g/L, obtiveram uma melhor produção em temperaturas entre 26°C e 37°C.

Em relação ao pH do meio, em função do tempo de fermentação, foi observada uma variação de acordo com a temperatura empregada. Na maior produção de bacitracina, o pH observado foi de 6,48. De acordo com Burgess, Lindsay e Flint (2010), *B. licheniformis* cresce em pH variando de 5,5 a 8,5. Farzana et. al. (2004), utilizando óleo de sementes de oleaginosas como substrato, para a produção de bacitracina

por *B. licheniformis* em fermentador agitado, obtiveram atividade antibiótica após 30h de incubação, com pH 7,6. Ainda segundo Farzana et. al. (2004), os valores de pH são elevados devido à liberação de compostos de amônio, podendo ocorrer a diminuição do pH no início da fermentação devido à produção de ácidos orgânicos.

A glicose é usualmente uma excelente fonte de carbono para o crescimento bacteriano, interferindo na síntese de muitos metabólitos secundários, dentre eles a bacitracina. Em alguns microrganismos, foi relatado um efeito inibitório da glicose com a redução do pH (AWAIS et. al., 2008; TABBENE et. al., 2009). O maior consumo de glicose por *B. licheniformis* para produção de bacitracina ocorreu após 32h de crescimento. Em estudo realizado por Liu et. al. (2011), buscando uma produção eficiente de acetoína, aromatizante produzido por *B. licheniformis*, utilizando 100g/L de glicose, foi observado que a concentração de glicose cai rapidamente depois de 8h e chega a zero após 36h.

Entretanto, polissacarídeos ou oligossacarídeos, como a lactose, são frequentemente considerados como melhores fontes de carbono para a produção de antibióticos. Isso pode ser devido à rápida utilização da glicose para síntese de material genético e a lactose, sendo consumida mais lentamente, estaria disponível para a síntese dos antimicrobianos (TABBENE et. al., 2009). De acordo com DONG et. al. (2010), *B. licheniformis* cultivado em meio composto por ervas chinesas adicionado a diferentes fontes de carbono, observa que a bactéria tem a capacidade de degradar tanto glicose como lactose. A detecção da produção do antibiótico nos ensaios 1 e 7 (Tabela 3), sem adição de glicose, indica que o microrganismo estudado possui potencial para degradação de lactose.

A produção de moléculas bioativas, dentre elas os antibióticos, é uma das áreas de aplicação farmacológicas mais exploradas da biotecnologia. Diferentes constituintes presentes nos meios de cultura, como fontes de carbono, nitrogênio e sais, além de pH, temperatura e estado físico do meio, podem influenciar a produção dessas moléculas. Geralmente, a produção de metabólitos secundários é observada em meios ricos, capazes de manter um rápido crescimento, e onde os nutrientes provavelmente reprimem a formação das enzimas inibidoras da síntese desses metabólitos (AZEVEDO, PIMENTA e VIEIRA, 2004; TABBENE et. al., 2009).

Detecção da produção de bacitracina

A partir da realização dos testes de difusão em disco, foi observada a inibição do crescimento de *M. flavus*, utilizado como microrganismo-teste. A produção do antibiótico foi observada a partir de 24h após o início do crescimento bacteriano, sendo a máxima produção obtida após 72h, nas diferentes temperaturas: 14mm (28°C), 19mm (46°C) e 27mm (37°C), conforme a figura 2. Resultado semelhante foi obtido por Jamil et. al. (2007), ao isolarem *B. subtilis* do solo para avaliar o potencial de produção de antibióticos peptídicos por esses microrganismos, alcançou a melhor atividade contra *M. luteus* a 37°C, tendo obtido também resultados a 30°C e a 50°C.

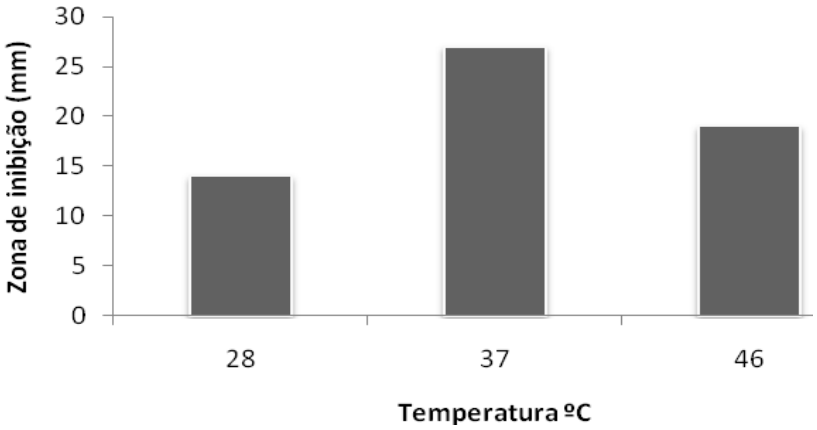

Figura 2 - Influência da temperatura na produção de bacitracina por *B. licheniformis*.

Nos ensaios realizados nos níveis intermediários do planejamento fatorial, foi obtida a melhor produção, na qual foram observados halos de 17mm, 27mm e 20mm de diâmetro, após 60h, 72h e 84h, respectivamente, conforme ilustrado na figura 3.

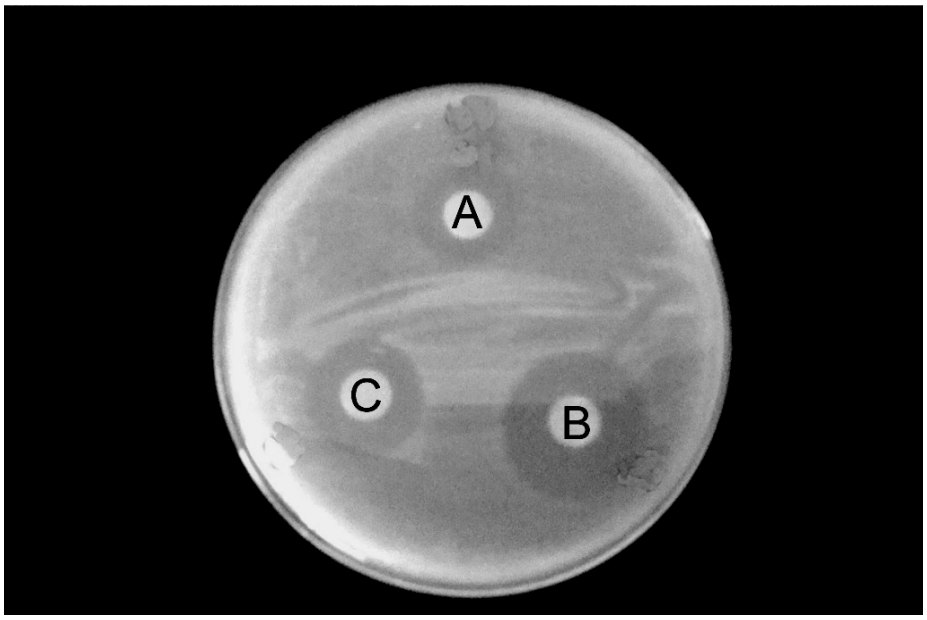

Figura 3 - Zonas de inibição obtidas na fermentação realizada a 37 °C, após 60h(A), 72h(B) e 84h(C).

KUTA, NIMZING e ORKAA (2009), ao realizarem triagem de *Bacillus sp*. coletados do solo com potencial para produção de antibióticos, observaram que *B. licheniformis* apresentou efeito inibitório contra *Klebsiella sp.* (26mm), *Salmonella typhi* (16mm), *Streptococcus pyogenes* (11mm) e *Staphylococcus aureus* (5mm). Estudo de espécies de *B. licheniformis*, isolados de amostras de solo,

realizado por Al-Janabi (2006), investigou sua habilidade para produção de bacitracina. A atividade antibacteriana foi observada pela medida do halo de inibição, contra espécies de *S. aureus* (20 mm), *Streptococcus* beta-hemolíticos (21 mm), *Streptococcus* não-hemolíticos (21 mm), *Bacillus cereus* (22 mm) e *Escherichia coli*, na qual não houve formação de halo.

Efeitos das concentrações de glicose e de soro de leite sobre a produção de bacitracina

Pode-se verificar que os ensaios fermentativos 3, 4 e 8 não apresentaram atividade antimicrobiana e ambos possuem como característica comum a concentração de soro de leite 70%. A análise do diagrama de Pareto, ilustrado na figura 4, confirma que o soro de leite teve um efeito significativo na produção do antibiótico, sendo este efeito negativo, significando que o maior nível desta variável foi prejudicial à produção do antibiótico. A análise estatística permite também observar que a glicose e o soro de leite, quando combinados em concentrações elevadas, produziram um efeito negativo sobre o aumento do halo de inibição.

Tal observação leva a concluir que, a mudança dos fatores temperatura e concentrações de glicose e de soro de leite do nível inferior para o superior não favoreceram a produção da bacitracina, o que confirma que a melhor produção do antibiótico foi observada quando utilizadas as condições do ponto central: temperatura de 37°C, glicose e soro de leite nas concentrações de 20g/L e 40% v/v, respectivamente.

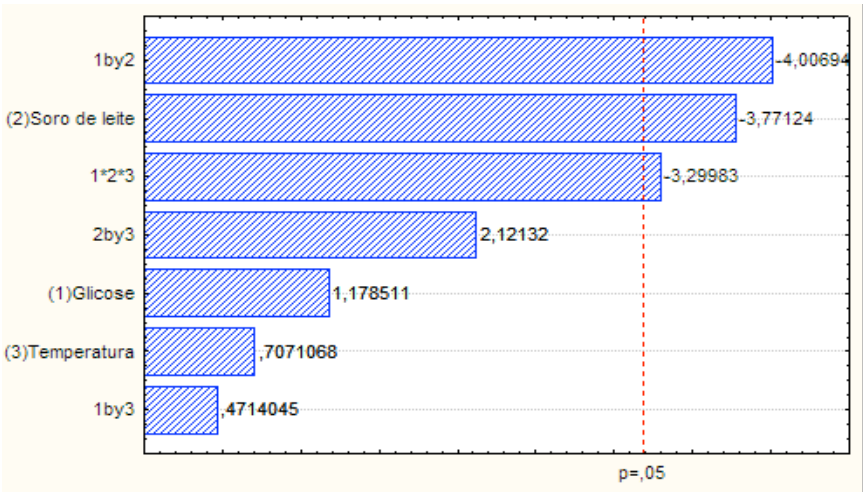

Figura 4 - Diagrama de Pareto para a resposta atividade antibiótica, após 72h de incubação.

Os resultados levaram a concluir que altas concentrações de soro de leite juntamente com elevados níveis de glicose não favoreceram a produção de bacitracina. Tais resultados estão de acordo com Haddar et. al. (2007), que obteve produção eficiente de bacitracina quando *B. licheniformis* foi cultivado em meio composto por menores concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio utilizadas (glicerol e ácido glutâmico, respectivamente). Da mesma forma que Tabbene et. al. (2009), buscando a

otimização da composição de meio para produção de antimicrobianos por *B. subtilis*, alcançaram atividade máxima utilizando baixas concentrações combinadas de lactose como fonte de carbono e de succinato de amônia, fonte de nitrogênio.

Nascimento et. al. (2007) e Dias et. al. (2008) utilizaram soro de leite como meio de cultura para produção de proteases por *Bacillus sp*, concluindo que esse substrato é também uma alternativa para a produção de enzimas proteolíticas. O soro de leite apresentou ainda potencial para produção de goma xantana pela bactéria *Xanthomonas campestris* (NERY et. al., 2008), indicando que esse resíduo vem sendo estudado como alternativa promissora em bioprocessos.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o potencial biotecnológico de *Bacillus licheniformis* (UCP1010) para produção de bacitracina utilizando soro de leite como substrato. Para a produção do antibiótico, foi utilizado o meio de produção padrão, substituindo o ácido glutâmico pelo soro de leite, tendo glicose como fonte adicional de carbono. A influência das variáveis temperatura, concentrações de glicose e de soro de leite foi avaliada através de um planejamento fatorial 2^3. A produção foi detectada através do teste de difusão em disco, utilizando *Micrococcus flavus* como microrganismo-teste. De acordo com os resultados obtidos, a melhor produção ocorreu a 37°C, em pH alcalino, após 72h de crescimento, com halos de 27mm de diâmetro, indicando que os ensaios realizados nas condições do ponto central apresentaram melhor potencial para produção de bacitracina. Assim, as concentrações de soro de leite 40% (v/v) e de glicose 20g/L mostraram-se mais eficientes para a produção do antibiótico.

Palavras-chave: antibióticos, glicose, rejeitos industriais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FACEPE, CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

AL-JANABI, A. A. H. S. (2006), Identification of bacitracin produced by local isolated of *Bacillus licheniformis*. African Journal of Biotechnology, **5 (18)**, 1600-1601.

ALMEIDA, K. E., BONASSI, I. A., ROÇA, R. O. (2001), Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. Ciência e Tecnologia de Alimentos, **21(2)**, 187-192.

AWAIS M. et. al. (2007), Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus sp*. Pakistan Journal of Botany**, 39(4),** 1303-1312.

AZEVEDO, R. C. L. S.; PIMENTA, F. C.; VIEIRA, J. D. G. (2004), Determinação da atividade antimicrobiana de *Actinoplanes* isolados do solo de cerrado goiano e o efeito citotóxico do extrato etanólico bruto dos isolados. Revista de Patologia Tropical, **33(2)**, 217-226.

BIASUTTI, E. A. R. et. al. (2008), Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados proteicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **44**.

BIASUTTI, E. A. R. (2006), Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina. Dissertação, **Faculdade de Farmácia da UFMG**, Belo Horizonte, Brasil.

BHUNIA, B., DUTTA, D.; CHAUDHURI, S. (2010), Selection of suitable carbon, nitrogen and and sulphate source for the production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042. Notulae Scientia Biologicae**, 2(2)**:56-59.

BOER, A. S.; PRIEST, F.; DIDERICHSEN, B. (1994), On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. Applied Microbiology and Biotechnology, **40**:595-598.

BURGESS, S. A.; LINDSAY, D.; FLINT, S. H. (2010), Termophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal of Food Microbiology, **144**:215-225.

CARVALHO, A. L. U. et. al. (2010), Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. Brazilian Arquives of Biology and Technology, **53**, 643-652.

CLERCK, E. D.; VOS, P. D. (2004), Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources. FEMS Microbiology Letters, **231:** 91-98.

CORDI, L. et. al. (2007), Intumescimento filamentoso no processo de lodos ativados aplicado ao tratamento de soro de queijo: caracterização e uso de floculantes para melhorar a sedimentabilidade**.** Engenharia Ambiental, **4**:26-37.

COSTA, A. M. C. (2008), Desempenho de filtro anaeróbio no tratamento de efluente formulado com diferentes concentrações de soro de queijo. Dissertação, **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, Brasil.

DIAS, D. R. et. al. (2008), Alkaline protease from *Bacillus sp.* isolated from coffee bean grown on cheese whey. World Journal of Microbiology and Biotechnology, **24**: 2027-2034.

DONG, W. et. al. (2010), Optimization of the growth culture medium with traditional Chinese herbs and conditions of *Bacillus licheniformis* SH003. Paper presented at **4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering**, 18-29/Jun, Chengdu, China.

FARZANA, K. et. al. (2005), Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, **18**, 55-57.

FARZANA, K. et. al. (2004), Biosynthesis of bacitracin in stirred fermenter by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. Journal of Research (Science), **15**, 285-290.

HADDAR, H. O. et. al. (2007), Optimization of bacitracin production by *Bacillus licheniformis* B5. Pakistan Journal of Biological Sciences, **10(6)**:972-976.

HASAN, F. et. al. (2009), Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. Pak. J. Bot., **41(3)**: 1499-1510.

INJAC et. al.(2008), Densitrometic determination of zinc bacitracin and nystatin in animal feed. Journal of the Science of Food and Agriculture, **88**:1576-1581.

ISHIHARA et. al. (2002), Distribution and variation of bacitracin synthetase gene sequences in laboratory stock strains of *Bacillus licheniformis***.** Current Microbiology, **45**, 18-23.

JAMIL, B. et. al.(2007), Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. Pak. J. Pharm. Sci., **20(1)**:26-31.

KALEEM, N.; IQBAL, M.; JAMIL, A. (2000), Production of antimicrobial agents by *Bacillus subtilis* through fermentation of molasses. Pakistan Journal of Biological Science**s**, **3(8)**: 1326-1329.

KHALIL, R. et. al. (2009), Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. Pakistan Journal of Nutrition, **8(3)**:242-250.

KUTA, F. A., NIMZING, L., ORKA`A, P. Y. (2009), Screening of *Bacillus* species with potentials of antibiotics production. Applied Medical Informatics, **24**, 42-46.

LIRA et. al. (2009), Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29 (1)**: 33-37.

LIU, Y. et. al. (2011), Efficient production of acetoin by the newly isolated Bacillus licheniformis strain MEL09. Process Biochemistry, **46**, 390-394.

MATOS et. al. (2009), Study on the dissemination of the *bcrABDR* cluster in *Enterococcus* spp. reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance**.** International Journal of Antimicrobial Agents, **34,** 142-147.

MOTTA, A. S.; BRANDELLI, A. (2002), Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. Journal of Applied Microbiology, **92**:63-70.

NASCIMENTO, W. C. A. et. al. (2007), Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* termofílico. Ciênc. Tecnol. Aliment**., 27(2**): 417-421.

NERY, T. B. R. et. al. (2008), Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. Quim. Nova, **31**, 1937-1941.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. (2001), Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C_7L^1. Ciênc. Tecnol. Aliment**.**, **21(1**), 82-85.

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

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. (2008), Aproveitamento do soro de leite no enriquecimento nutricional de bebidas. Braz. J. Food Technol., **VII BMCFB**.

QI, Z. et. al.(2008), Characterization of the mechanism of the *Staphylococcus aureus* cell envelope by bacitracin and bacitracin-metal ions. J. Membrane Biol., **225**: 27-37.

REY, M. W. et. al. (2004), Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. Genome Biology, **5**:R77.

SIN, D. W.; WONG, Y. (2003), Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. Trends in Analytical Chemistry, **22**.

SONGSIRIRITTHIGUL, C. et. al. (2010), Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. Bioresource Technology, **101**:4096-4103.

TAMANINI, C., HAULY, M. C. O. (2004), Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. Semina: Ciências Agrárias, **25**, 315-330.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ A maior produção de bacitracina foi observada quando as variáveis do planejamento fatorial foram utilizadas em seus níveis intermediários: 37°C, 20g/L de glicose e 40% (v/v) de soro de leite.

- ✓ A maior produção do antibiótico ocorreu após 72 horas de crescimento, em pH 6,48.

- ✓ Todas as temperaturas favoreceram a produção do antibiótico, destacando a temperatura de 37°C, na qual foram obtidos os melhores resultados.

- ✓ O soro de leite, quando utilizando em altas concentrações, influenciou negativamente a produção da bacitracina.

- ✓ A produção do antibiótico nos meios sem a presença de glicose indica que *B. licheniformis* (UCP1010) possui potencial para utilização de lactose como fonte de carbono.

ANEXOS

Instruções da Revista Brazilian Archives of Biology and Technology

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Scope: The **Brazilian Archives of Biology and Technology**, publishes original research papers, Short notes and Review articles in English in the interdisciplinary areas of biological sciences and engineering/technology.

Preparation of manuscripts: Submission of paper implies that it has not been published or being considered for publication elsewhere. Care should be taken to prepare a compact manuscript with precision in presentation, which will help authors in its acceptance. All the papers are subjected to review by referees.

Manuscript: Three copies of the single-spaced typed manuscript (maximum 12 pages) on a high grade A-4 size paper (210x297 mm), with margins (left 25, right 20, superior and inferior 30 mm) should be prepared. This should be divided under the following headings: ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, ACKNOWLEDGEMENTS, RESUMO, REFERENCES. These headings should be typed in bold upper case (12 font).
Title: The title (18 font, bold) of the paper should clearly reflect its contents. It should be followed by the name(s) of author(s) with expanded initials (12 font, bold) and the address(s) (*italic*, 10 font) of the institution(s) where the work has been carried out.
ABSTRACT: Each paper should be provided with an abstract (*italic*) of 100-150 words, describing briefly on the purpose and results of the study. It should be prepared as concisely as possible.
Key words: Authors should provide three to six key words that will be used in indexing their paper.
INTRODUCTION: This should describe the background and relevant information about the work. It should also state the objective of the work.
MATERIALS AND METHODS: Authors must take care in providing sufficient details so that others can repeat the work. Standard procedures need not be described in detail.
RESULTS AND DISCUSSION: Results and Discussion may be presented separately or in combined form (authors may decide easier way for them). Preliminary work or less relevant results are not to be described. The reproducibility of the results, including the number of times the experiment was conducted and the number of replicate samples should be stated clearly.
RESUMO: An abstract of the paper should also be prepared in Portuguese and placed before the list of References. Authors from other than Latin American countries can seek the help of Editor's office to prepare Portuguese resumo of their papers.
REFERENCES: References in the text should be cited at the appropriate point by the name(s) of the author(s) and year (e.g. Raimbault & Roussos, 1996; Raimbault *et al*., 1997). A list of references, in the alphabetic order (10 font), should appear at the end of the manuscript. All references in the list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished results should not be included in the list. Examples of references are given below.
In journals:
Pandey, A. (1992), Recent developments in solid state fermentation. *Process Biochem*., 27, 109-117

Thesis:
Chang, C. W. (1975), Effect of fluoride pollution on plants and cattle. PhD Thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India
In books:
Tengerdy, R. P. (1998), Solid substrate fermentation for enzyme production. In- *Advances in Biotechnology*, ed. A. Pandey. Educational Publishers & Distributors, New Delhi, pp. 13-16
Pandey, A. (1998), *Threads of Life*. National Institute of Science Communication, New Delhi
In conferences:
Davison, A. W. (1982), Uptake, transport and accumulation of soil and airborne fluorides by vegetation. Paper presented at 6thInternational Fluoride Symposium, 1-3 May, Logan, Utah
Tables and Figures: Tables and figures, numbered consecutively with arabic numerals must be inserted at appropriate place in the text. These should be used to present only those data, which can not be described in the text.
Units and Abbreviations: The SI system should be used for all experimental data. In case other units are used, these should be added in parentheses. Only standard abbreviations for the units should be used. Full stop should not be included in the abbreviation (e.g. m, not m. or rpm, not r.p.m.). Authors should use '%' and '/' in place of 'per cent' and 'per'.
Manuscript lay-out: It is suggested that authors consult a recent issue of the journal for the style and layout. Except the title, abstract and key words, entire text should be placed in two columns on each page. Footnotes, except on first page indicating the corresponding author (8 font) should not be included. The entire manuscript should be prepared in Times New Roman, 11 font (except reference list, which should be in 10 font).
Spacing: Leave one space between the title of the paper and the name(s) of the author(s), and between the headings and the text. No space should be left between the paragraphs in the text. Leave 0.6-cm space between the two columns.
Electronic submission: Manuscript should be accompanied by a diskette indicating the name and version of the word processing programme used (use only MS Word 6/7 or compatible).
Referees: When submitting the manuscript authors may suggest up to three referees, preferably from other than their own countries, providing full name and address with email. However, the final choice of referees will remain entirely with the Editor.
Page charges and reprints: There will be no page charges. Reprints can be ordered up on acceptance of the paper. Manuscripts and all correspondence should be sent to the Editor, Prof. Dr. Carlos R. Soccol - **Brazilian Archives of Biology and Technology**.