



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

Leonila Maria Leandro Acioly

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR
Bacillus subtilis **UCP 0999 EM SUBSTRATOS NÃO**
CONVENCIONAIS E DE BAIXO CUSTO

Recife- PE

2009

Leonila Maria Leandro Acioly

**PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTE POR
Bacillus subtilis UCP 0999 EM SUBSTRATOS NÃO
CONVENCIONAIS E DE BAIXO CUSTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais 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: Tecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo

Recife - PE

2009

ACIOLY, Leonila Maria Leandro

Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* UCP 999 em Substratos Não Convencionais e de Baixo Custo. / Leonila Maria Leandro Acioly; orientadora Galba Maria de Campos Takaki; co-orientadora Leonie Asfora Sarubbo, ??? f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2009.

1. Biossurfactante. 2. Surfactina. 3. Batata. 4. Farelo de arroz. 5. Soja. Campos-Takaki, Galba Maria. II. Sarubbo, Leonie Asfora. III. Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* UCP 999 em substratos não convencionais, como fonte de carbono.

CDU 576.8

**PRODUÇÃO DE BIODERIVADO POR *BACILLUS SUBTILIS* UCP 0999
EM SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS E DE BAIXO CUSTO**

Leonila Maria Leandro Acioly

Examinadores:

Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a Dr^a Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Defendida em:

Coodenadora: Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

DEDICO

*Aos meus pais, Socorro Acioly e Paulo Acioly,
pelo amor, dedicação, carinho e ensinamentos.*

*Aos meus queridos irmãos, Paulinho e Ênio Petrônio,
pelo incentivo nos meus estudos e companheirismo.*

*Aos meus queridos tios, João Carlos,
Maria José, Francisco Alberto (in memória), Edleuza e José Augusto,
pelos muitos ensinamentos e oportunidade de uma melhor educação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, que se fez presente na minha vida, me iluminando e dando forças durante toda essa caminhada.

À minha orientadora Prof^a. Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki, muito obrigada. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela orientação sempre motivadora e pela amizade e confiança em mim.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr.^a Leonie Asfora Sarubbo, por estar sempre disposta a me ajudar em todos os momentos que precisei.

Ao Prof.^o Dr^o Carlos Alberto pela amizade, conselhos nos momentos mais difíceis e conhecimentos compartilhados.

Ao Prof.^o Dr^o Valdemir Alexandre pela grande ajuda na realização deste trabalho.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J., pelo acesso aos laboratórios do NPCIAMB/UNICAP, para a realização desta pesquisa.

Ao Pe. Theodoro Paulo Severino Peters, S.J., ex - Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, pelo apoio na minha formação durante a graduação.

Aos professores Dr. Elias Basile Tambourgi e Dr. Flávio Vasconcelos, pela acolhida, orientação e auxílio durante o intercâmbio na Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - S.P.;

Ao técnico Severino Humberto de Almeida, aos laboratoristas Salatiel Joaquim de Santana e André Felipe de Lima, pelo apoio, paciência e colaboração, em todos os momentos. À secretária Sônia Maria de Souza, por todos os conselhos e apoio no decorrer do desenvolvimento desta dissertação.

À minha grande amiga Marcela Vieira, pela amizade sincera, paciência, companheirismo, por me ouvir e aconselha.

Aos colegas de laboratório, em especial Fabíola Carolina Gomes Almeida, pela ajuda na elaboração desse trabalho e Geisane Messias, aluna do Pibic, que me ajudou muito nos trabalhos práticos.

Aos amigos Aline Barbosa, Mayara, Amanda, Marta Cristina, Kenji, Rodolfo, Karla, Luiz, Conceição, Hélvia, Raquel e a todos aqueles que participaram desta etapa da minha vida.

Aos meus primos, Alexsandro, Milena, Giselle, Geovanna, Augusto César, Marília e Priscila, pela amizade e companheirismos durante todos os anos de convivência. Aos meus avós, Leonila, Pedro Severo, Josefa Leandro e Fulgêncio (*in memória*), pela presença constante na minha vida e pelas preces.

Às instituições de fomento à pesquisa: CAPES, CNPq e FINEP, pelo suporte financeiro para realização desta etapa acadêmica, em especial ao Programa de Cooperação Acadêmica - CAPES/PROCAD, por haver proporcionado o intercâmbio com a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP – SP.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1	
1 Introdução	16
2 Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 Revisão da Literatura	19
3.1 Biotecnologia Microbiana: considerações gerais.....	19
3.2 Surfactantes.....	21
3.3 Biossurfactantes.....	23
3.3.1 Classificação Química e Microrganismos Produtores de Biossurfactantes	25
3.4 Surfactina.....	30
3.4.1 Histórico.....	30
3.4.2 Estrutura Química.....	31
3.4.3 Características Gerais de <i>Bacillus subtilis</i> e Linhagens Produtoras de Surfactina.....	35
3.4.4 Propriedades e Aplicações da Surfactina.....	37
3.4.5 Produção de Surfactina.....	37
3.4.5.1 Substratos Não-Convencionais de Surfactina.....	38
4 Referências Bibliográficas	41
CAPÍTULO 2 – Produção de Biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> em Fermentação Submersa Utilizando Substratos Agroindustriais, como Meios Alternativos.	
Resumo	56
1 Introdução	57
2 Materiais e Métodos	58
2.1 Microrganismo.....	58
2.2 Substratos.....	58
2.3 Métodos Microbiológicos.....	58
2.4 Métodos Analíticos.....	59
3 Resultados	61
4 Discussão	62
5 Referências	65

CAPÍTULO 3	68
Conclusões Gerais	69
ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura da molécula anfipática do surfactante (fonte: http://mechleans.com/content/what-surfactnt).....	21
Figura 2. Comportamento do surfactante na interface ar água (fonte: www.kibron.com/.../Science/micellization.gif).....	22
Figura 3. Rhamnolipídeos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (fonte: Costa, 2005).....	27
Figura 4. Fosfatidilitolamina, produzido por <i>Acetivobacter sp</i> (fonte: Costa, 2005).....	27
Figura 5. Estrutura do Emulsan, <i>Acetivobacter caloaceticus</i> (fonte: Costa, 2005).....	28
Figura 6. Estrutura da Surfactina (fonte: Desai e Banat, 1997).....	31
Figura 7. Estrutura da principal isoforma da Surfactina (fonte: Barros <i>et al.</i> , 2007).....	32

CAPÍTULO 2

Figura 1. Halo de hemólise produzido por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 em ágar sangue.....	75
Figura 2. Gráfico de produção de biomassa (g/L) e biossurfactante (mg/L) por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 no meio contendo farelo de arroz sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia.....	76
Figura 3. Gráfico do índice de emulsificação (%) e tensão superficial (mN/m) com líquido metabólico após 72 horas de fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 no meio contendo farelo de arroz sem e com adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia em óleo de motor, diesel e querosene.....	76
Figura 4. Gráfico da produção de biomassa (g/L) e biossurfactante (mg/L) pro <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 em meio contendo batata inglesa sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia.....	77
Figura 5. Gráfico do índice de emulsificação (5) e tensão superficial (mN/m) com líquido metabólico após 72 horas de fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 no meio contendo batata inglesa sem e com adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia em óleo de motor, diesel e querosene.....	77
Figura 6. Gráfico da produção de biomassa (g/L) e biossurfactante (mg/L) por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 no meio contendo soja sem e com adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia.....	78
Figura 7. Gráfico do índice de emulsificação (%) e tensão superficial (mN/m) com líquido metabólico após 72 horas de fermentação por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 no	

meio contendo soja sem e com adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia em óleo de motor, diesel e querosene.....78

Figura 8. Espectro infravermelho da amostra de surfactante produzida por *Bacillus subtilis* UCP 999 em meio contendo soja.....79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos, microrganismos produtores e referências.....	27
Tabela 2. Microrganismos produtores de Surfactina, meios de produção e bibliografia.....	34

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Componentes dos meios de produção.....	71
Tabela 2. Composição da solução de micronutrientes.....	71
Tabela 3. Produção de biomassa (g/L), pH, índice de emulsificação (%), tensão superficial (mN/m) e rendimento do biossurfactante (mg/L) produzido por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 em meio com farelo de arroz.....	72
Tabela 4. Produção de biomassa (g/L), pH, índice de emulsificação (%), tensão superficial (mN/m) e rendimento do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 em meio de batata inglesa.....	73
Tabela 5. Produção de biomassa (g/L), pH, índice de emulsificação (%), tensão superficial (mNm) e rendimento do biossurfactante produzido por <i>Bacillus subtilis</i> UCP 999 em meio de soja.....	74

RESUMO

Os biossurfactantes são biopolímeros utilizados em vários setores industriais, porém ainda, não são economicamente competitivos com os surfactantes sintéticos, devido aos elevados custos de produção, onde o substrato representa 30% dos custos finais. Na busca de fontes alternativas e de baixo custo, no presente trabalho foi investigada as fontes agroindustriais, farelo de arroz (*Oryza sativa*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*) e soja (*Sorghum vulgare*), como meio líquido para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UCP0999. Os ensaios foram realizados com e sem a adição de (2g/L) de peptona, sulfato de amônia e ou (0,01mL/L) de micro nutrientes, os quais foram inoculados com 5% de uma cultura de *B. subtilis* (10^6 UFC/mL), mantidos sob agitação orbital de 200rpm, por 30°C por 72 h. Ao final da fermentação, as células coletadas corresponderam a biomassa e do líquido metabólico livre de células foram avaliados pH, tensão superficial, índice de emulsificação (óleo de motor, diesel e querosene) e extração do biossurfactante produzido. Os resultados demonstraram que a bactéria utilizou o farelo de arroz e soja suplementado com peptona, produzindo um surfactante que reduziu a tensão superficial da água 72 mN/m para 37,80 mN/m e 37,70, respectivamente. A soja suplementada com micro nutrientes reduziu a tensão para 35,60 Mn/m. Por outro lado, quando utilizou o farelo de arroz suplementados com micro nutrientes e sulfato de amônia, produziram uma maior quantidade de biossurfactante, com 8,60 e 6,1 g/L, respectivamente, não apresentando resultados significativos quanto a redução da tensão superficial. Os biossurfactantes produzidos apresentaram altos índices de emulsificação em óleo de motor, querosene e diesel com valores de 30 a 100%, sendo os mais altos índices com caldo de batata e de soja, suplementados com micro nutrientes e sulfato de amônia. O biossurfactante produzido nos diferentes meios formulados demonstrou grande potencial de emulsificação de substâncias hidrofóbicas e redução da tensão superficial, possibilitando utilização futura nos processos de biorremediação.

Palavras-Chave: Biossurfactante, *Bacillus subtilis*, Substratos agroindustriais, Surfactina.

ABSTRACT

The biosurfactants biopolymers are used in various industrial sectors, but still, are not economically competitive with synthetic surfactants, due to high production costs, where the substrate is 30% of the final costs. In search of alternative and low cost in the present study, we investigated the sources agribusiness, rice bran (*Oryza sativa*), potato (*Solanum tuberosum*) and soybean (*Sorghum vulgare*), as a liquid medium for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* UCP0999. Assays were performed with and without the addition of (2g / L), peptone, ammonium sulfate and either (0.01 mL / L) of micro-nutrients, which were inoculated with 5% of a culture of *B. subtilis* (106 CFU / mL), kept under orbital agitation of 200 rpm for 30 ° C for 72 h. At the end of fermentation, the cells collected corresponded to biomass and metabolic cell-free liquid were evaluated pH, surface tension, emulsification index (motor oil, diesel and kerosene) and extracting the biosurfactant produced. The results showed that the bacteria used and the rice bran supplemented with soy peptone, producing a surfactant to reduce surface tension of water to 72 mN / m to 37.80 mN / m and 37.70, respectively. The soy supplemented with micronutrients to reduce the tension 35.60 mN / m. On the other hand, when the used rice bran supplemented with nutrients and micro ammonium sulfate produced a greater quantity of biosurfactant with 8.60 and 6.1 g / L, respectively, showing no significant results regarding the reduction of surface tension . The biosurfactants produced showed high emulsification in motor oil, kerosene and diesel with values from 30 to 100%, with the highest rates with potato broth and soy supplemented with micronutrients and ammonium sulphate. The biosurfactant produced in the different media formulated demonstrated great potential for emulsification of hydrophobic substance and surface tension reduction, allowing for future use in bioremediation processes.

Keywords: Biosurfactante, *Bacillus subtilis*, agroindustrial substrates, Surfactin.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos de superfície ativa capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial, distribuindo-se nas interfaces entre líquidos com diferentes graus de polaridade. Esse fato permite a dispersão ou a mistura de líquidos como água e óleo em forma de emulsões (BANAT et al., 1999). Esses compostos químicos são usados nos mais diversos setores industriais, e a demanda do mercado vem sendo atendida pelos surfactantes de origem petroquímica e, por vezes, apresentam alta toxicidade, baixa biodegradabilidade e são bioacumuladores (BOGNOLO, 1999). O total de surfactantes químicos e biológicos produzidos nos Estados Unidos e no mundo inteiro é estimado em mais de 10 bilhões, correspondendo a 25 bilhões de dólares, respectivamente (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004). Contudo, cerca de 54% do total de surfactantes produzidos é destinado à fabricação de detergentes, além de outros produtos de utilidade doméstica (BANAT et al. 1999). Portanto, a biotecnologia vem trazendo novas alternativas para substituição de compostos químicos, considerados potencialmente danosos a natureza e ao ser humano, por compostos de origem natural e produzidos a partir de fontes denominadas de renováveis. A biotecnologia inclui qualquer técnica que utilize organismos vivos (ou partes de organismos), com o objetivo de produzir ou modificar produtos, aperfeiçoar plantas ou animais e descobrir microrganismos para usos específicos (ALBAGLI, 1998). Neste contexto, os biossurfactantes atualmente são uma das alternativas da biotecnologia para um maior incremento do mercado dos tensoativos, como biopolímeros produzidos pelo metabolismo de diversos microrganismos, em especial, as bactérias. Assim, como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de diferentes substâncias, apresentando baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, podendo ser produzidos a partir de substratos renováveis e de baixo custo (NITSCHKE,PASTORE, 2002). Estes biopolímeros apresentam-se como moléculas anfipáticas que possuem em sua estrutura grupos hidrofílicos e hidrofóbicos o que lhes conferem uma ampla aplicabilidade nas diversas indústrias que envolvem: divergência, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE, COSTA, 2002). O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria de petróleo, tanto para a produção de petróleo, ou incorporados em formulações de lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e

mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo (MEOR) (VAN DYKE *et al.*, 1991; CARLI, 2006).

A indústria farmacêutica também faz uso dos biossurfactantes nos compostos de antibióticos, que tem a capacidade de romper a membrana celular dos microrganismos promovendo a destruição celular, como exemplo pode-se citar os lipopeptídeos produzidos por "*Bacillus subtilis*", os quais exibem atividade antifúngica e antibacteriana. (BANAT, 1995; BALLESTEROS, 2005).

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas, como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral. O biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* inibiu o vírus do herpes simples e vírus parainfluenza (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Neste sentido, a utilização de substratos de baixo custo vem sendo objeto de várias investigações, em especial, as fontes agro-industriais, considerando o elevado conteúdo de carboidratos, proteínas e lipídeos. No entanto, torna-se necessário encontrar um balanço correto entre carbono e nitrogênio para proporcionar o crescimento microbiano e a produção do biossurfactante, tem sido ainda um grande desafio, a busca de novas fontes alternativas de baixo custo, para a geração de produtos de elevado valor agregado (MERCARDE, MANRESA, 1994).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a utilização dos substratos não convencionais e de baixo custo (farinha de palha de arroz, batata e soja em grãos) no crescimento de *Bacillus subtilis* e na produção de biossurfactantes

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de *B. subtilis* utilizando substratos não convencionais (farinha de palha de arroz, batata e soja em grãos);
- Investigar a produção de biossurfactante por *B. subtilis* a partir de farinha de palha de arroz, batata e soja em grãos;
- Avaliar a influência da suplementação com sulfato de amônia, peptona e micronutrientes nos substratos não convencionais (farinha de palha de arroz, batata e soja em grãos) na produção de biossurfactante por *B. subtilis*;
- Realizar a cinética de produção de biossurfactante no meio e condições selecionadas;
- Produzir, isolar os biossurfactantes obtidos do meio contendo as fontes não convencionais;
- Avaliar estatisticamente os resultados obtidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biotecnologia Microbiana: Considerações Gerais

A utilização de organismos vivos com finalidades práticas, como a produção de bebidas e a transformação de alimentos, constituem uma tradição milenar. Ao final do século XIX, a teoria microbiana formulada pelo químico Louis Pasteur para explicar a causa de enfermidades humanas e animais, não apenas revolucionou a medicina e a biologia, mas introduziu aperfeiçoamentos nas técnicas das fermentações. Contudo, nas últimas três décadas do século XX, a biotecnologia conquistou avanços sem precedentes e isso teve início com o desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a manipulação de microrganismos vivos e de seus genes. Isso acabou promovendo novas perspectivas no âmbito da indústria tecnológica, principalmente pelo complexo químico-farmacêutico, que percebeu nesse arsenal uma oportunidade para dinamização biotecnológica (Azevedo *et al.*, 2002).

A Biotecnologia é definida como o conjunto de princípios científicos aplicados a procedimentos para a produção de bens e serviços mediante a utilização de agentes biológicos. Está integrada a um conjunto de técnicas que utilizam substâncias vivas (ou parte delas) para modificar ou fabricar um produto. As aplicações da biotecnologia são múltiplas: vai desde o aumento da produtividade da terra cultivável até a produção de novos medicamentos, vacinas e materiais de diagnóstico, passando pela conservação da biodiversidade genética e a restauração de elementos, como a água, o ar e o solo (BUENO, 2008). Desse modo, a biotecnologia permite que as tecnologias sejam aplicadas nos mais diversos setores industriais, os quais se distinguem três atividades: a engenharia genética, a engenharia de proteínas e a engenharia de metabólitos (BUENO, 2008).

As principais forças indutoras e direcionadoras para o desenvolvimento em biotecnologia são: a demanda econômica, direcionada pela indústria, as políticas nacionais e internacionais que, frequentemente são influenciadas pela pressão pública, e os avanços em ciência, tecnologia e inovação. Juntos, estes componentes catalisam o desenvolvimento da biotecnologia, com a geração de novos mercados, solução de problemas crônicos e emergentes, e a melhoria da eficiência e custos de processos industriais. Biotecnologia é um exemplo de inovação radical, no sentido em que proporciona a utilização de tecnologias inteiramente novas para atividades industriais existentes e permite a geração de novos insumos (BULL *et al.*, 2000).

Portanto, a biotecnologia é reconhecida como uma das tecnologias-capacitadoras para o século XXI, frente às suas características de inovação radical, impacto atual e potencial frente a problemas globais (doenças, nutrição e poluição ambiental) (KATE, 1999) e à promessa de desenvolvimento industrial sustentável (utilização de recursos renováveis, 'tecnologia limpa', e redução do aquecimento global) (BULL *et al.*, 1998). Biotecnologia faz uso de diversos compostos com propriedades tensoativas, seja na purificação de produtos biológicos ou por biocatálise, e também, respostas preventiva e curativa aos problemas que os tensoativos domésticos e industriais possam causar nas estações de tratamento de efluentes (ROCHA, 1999).

A contribuição que microrganismos têm dado para o desenvolvimento biotecnológico abrange diversas aplicações, como: a produção de compostos químicos (etanol, ácido acético, biogás, plásticos biodegradáveis, bioconversores na indústria de alimentos e farmacêutica.); produtos para agricultura (bioinseticidas e inoculantes agrícolas), enzimas para diversos setores industriais, com destaque para indústria de alimentos e compostos de interesse médico e veterinário (antibióticos, antitumorais, hipocolesterlêmicos, imunossupressores, inibidores enzimáticos, antiparasitários) (BARNUM, 1998).

A base para o desenvolvimento biotecnológico é o material biológico, que após ser adequadamente recuperado e avaliado pela presença de atributos desejáveis culmina com o desenvolvimento de um processo ou produto comercial (BULL *et al.*, 2000).

Do ponto de vista microbiano, o estudo da biodiversidade tem excepcional interesse científico. Um grande número de espécies de bactérias existe nas florestas úmidas. Estima-se que um grama de solo de floresta úmida possua cerca de 800 bactérias. Muitos microrganismos produzem metabólitos secundários biologicamente ativos. Centenas de antibióticos descobertos nos últimos 50 anos foram produzidas por bactérias. O interesse sobre os microrganismos também focalizam compostos com atividade pesticida, principalmente herbicida, inseticida a nematóide. As bactérias em especial, são utilizadas na degradação de poluentes industriais, na mineração e na recuperação dos diversos ecossistemas existentes (GARCIA, 1995).

Os microrganismos contribuem para o equilíbrio de ecossistemas atuando entre a biosfera e os constituintes atmosféricos gasosos. Podem-se encontrar microrganismos capazes de degradar herbicidas, pesticidas, inseticidas, óleos e esgotos poluidores. Assim, esses organismos participam da reciclagem de compostos químicos presentes na biosfera, incluindo a degradação de poluentes industriais. Podendo, portanto, participar ativamente da construção de uma melhor condição de vida nesse planeta (GARCIA, 1995).

O Brasil, sendo considerado um dos países com megadiversidade, que juntos concentram 70% da diversidade biológica do planeta (ComCiência, 2001), poderá garantir uma posição de vanguarda no desenvolvimento dessas tecnologias dependendo, portanto, de investimentos nessa área (STRELEC, 2006).

3.2 Surfactantes

Os Surfactantes são moléculas anfipáticas (figura 1), que apresentam em sua molécula grupos hidrofóbicos (apolar) e hidrofílicos (polar), essas características permitem diversas alterações nos sistemas heterogêneos, pois constituem substâncias de adsorção que alteram as condições preexistentes em interfaces (RON, ROSENBERG, 2001). Portanto, esses compostos tendem a concentrar-se nas interfaces de fluidos imiscíveis (figura 2), reduzindo assim a tensão superficial e interfacial, aumentando a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos ou compostos orgânicos insolúveis (SINGH et al, 2007).

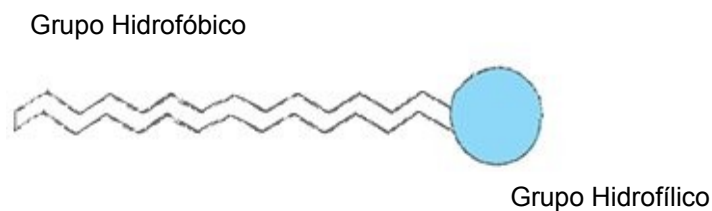


Figura 1. Estrutura da molécula anfipáticas do surfactante, (<http://mechleans.com/content/what-surfactant>).

A porção apolar é frequentemente formada por hidrocarbonetos de cadeia alifática, grupos aromáticos ou policíclicos. Esta parte da molécula tem uma baixa solubilidade em água devido ao “efeito hidrofóbico”, provocado não tanto pela atração entre grupos apolares, mas principalmente pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água (LICHTENBERG *et al.* 1983).

A porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e micronutrientes (sais) de amônio quaternário (catiônicos) (DESAI, BANAT, 1997; NISTCHKE, PASTORE, 2002).

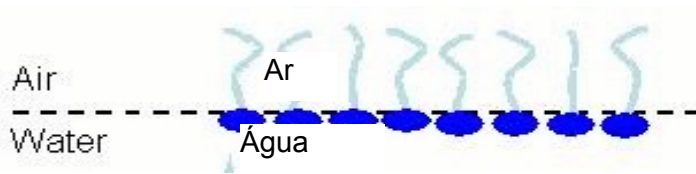


Figura 2. Comportamento do surfactante na interface ar água. (www.kibron.com/.../Science/micellization.gif)

A eficiência de um surfactante é determinada pela sua capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida da energia livre da superfície pela unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para superfície (MULLIGAN, 2004; PIRÔLLO, 2006). Mulligan (2004) descreve que, devido à presença de surfactantes, uma menor energia é requerida para levar uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida. Portanto, um bom surfactante, pode reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35mN/m e a tensão interfacial entre água e n-hexadecano de 40 para 1mN/m. A tensão superficial correlaciona-se com a concentração dos compostos tensoativos até o momento em que Concentração Micelar Crítica (CMC) é alcançada.

Pirôllo (2006) define a CMC como a solubilidade de um tensoativo na fase aquosa, ou seja, a concentração mínima de tensoativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, a partir da qual se inicia a formação de micelas. Surfactantes eficientes apresentam baixa concentração micelar, ou seja, menos surfactante é requerido para reduzir a tensão superficial. Na prática a CMC é também a concentração máxima dos monômeros de surfactante em água e é influenciada pelo pH, temperatura e força iônica (MULLIGAN, 2004).

Estas características tornam os surfactantes compostos químicos amplamente comercializados nos mais diversos setores industriais. O maior mercado para os surfactantes é a indústria petrolífera, onde são amplamente utilizados para recuperação terciária do petróleo (MEOR - Microbial Enhanced Oil Recovery), como na remoção e mobilização de resíduos de óleo e biorremediação (RON, ROSENBERG, 2002). No entanto, esses compostos não são biodegradáveis podendo ser tóxicos para os ecossistemas (BANAT, 1995). Os surfactantes apresentam aplicação industrial em larga escala, principalmente, nas indústrias de produtos de uso pessoal, amplamente utilizados. A ingestão acidental, mesmo em pequenas quantidades, é inevitável, uma vez que os surfactantes são constituintes de produtos como cremes dentais e cosméticos, cuja utilização freqüente pode acarretar na sua absorção (PORTER, 1994).

Os compostos tensoativos agem sobre a membrana citoplasmática desnaturando as proteínas celulares e, conseqüentemente, alterando o equilíbrio osmótico. A toxicidade está provavelmente relacionada à estrutura molecular, pois moléculas contendo cadeias ramificadas, com um número de átomos de carbono maior que 16, ou anéis aromáticos, são consideradas como as mais tóxicas (KANTIN, 1980 apud LIMA, 2007).

Durante a década de 80 a procura por surfactantes aumentou aproximadamente 300% dentro da indústria química, e a sua produção no ano de 2000 excedeu três milhões de toneladas por ano, gerando quatro bilhões de dólares (BANAT *et al.*, 2000).

A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo, entretanto, nos últimos anos o interesse por surfactantes, de origem microbiana, tem aumentado significativamente em decorrência de ser naturalmente biodegradáveis, reduzindo assim, o impacto ambiental causado pela aplicação dos surfactantes (MAKKAR, CAMEOTRA, 2002).

3.3 Biossurfactantes

Os compostos de origem microbiana, denominados biossurfactantes, são produtos metabólicos de microrganismos, em especial, bactérias que exibem propriedades surfactantes com alta capacidade emulsificante e redução da tensão superficial (SOO *et al.*, 2004).

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

Em geral os biossurfactantes permitem que os microrganismos cresçam em substratos hidrofóbicos, diminuindo a tensão superficial e conseqüentemente este componente se torna disponível para o seu metabolismo (STRELEC, 2006). Também existem situações em que a produção de biossurfactante está associada à interação das células com superfícies sólidas e aos fatores de virulência (SHAFI, KHANNA, 1995; NITSCHKE *et al.*, 2008).

Os biossurfactantes podem ser obtidos por procedimentos relativamente simples como, por exemplo, processos fermentativos, utilizando substratos de baixo custo

incluindo açúcares, óleos, alcanos, resíduos industriais e agrícolas. E ainda, dependendo do substrato e do microrganismo utilizado o biossurfactante produzido pode apresentar estruturas químicas diversas (BANAT *et al.*, 2000; HABA *et al.*, 2000; MESQUITA, 2004).

Os biossurfactantes podem ser produzidos intra, extracelulares ou através de constituintes da parede celular (BERTRAND *et al.*, 1994). A maioria destes compostos apresenta natureza lipídica. Ademais, estes biopolímeros apresentam propriedades semelhantes aos surfactantes sintéticos, por apresentarem também, na mesma molécula, grupos polares e apolares (COOPER *et al.* 1981). Em geral, o grupo hidrofóbico é constituído por longas cadeias de ácidos graxos, hidroxilados ou não, e seus derivados como ácidos α -alquil- β -hidroxi-graxos. A fração hidrofílica na molécula pode ser devido à presença de carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfato, ácidos carboxílicos, álcoois, ésteres, entre outros (PARRA *et al.*, 1989).

Muitas vezes, a célula microbiana, por si só, pode demonstrar significativa capacidade emulsificante e se comportar como um biossurfactante, a qual, pela a ação solvente de hidrocarboneto na superfície lipofílica da célula, pode causar a perda da integridade estrutural, liberando componentes tensoativos para o meio externo. Contudo, a célula intacta possuidora de capacidade emulsificante, pode ser por si só um biossurfactante, porém, apenas os biossurfactantes extracelulares têm o poder de reduzir a tensão superficial de uma fase aquosa (FRANCY *et al.*, 1991).

O grande interesse na produção biotecnológica dos biossurfactantes se deve as vantagens, destes apresentam em relação aos sintéticos, considerando as propriedades de biodegradabilidade, baixa toxicidade, redução com maior eficiência as tensões superficiais e interfaciais entre líquidos imiscíveis e baixa concentração micelar crítica (CMC). E ainda, podem ser produzidos a partir de substratos renováveis e apresentam estabilidade em valores extremos de pH e temperatura (FIECHTER, 1992; PRUTHI, CAMEOTRA, 1997; LANG, PHILP, 1998). Devido a essas propriedades, na última década, estes biopolímeros chamaram muito a atenção em vários campos como material multifuncional para o novo século (KITAMOTO *et al.* 2002). Entretanto, ainda não são amplamente utilizados devido ao alto custo de produção, associado aos métodos ineficientes de recuperação do produto, como também, o uso de substratos caros (ROCHA *et al.*, 2006).

O uso de substratos alternativos como resíduos agroindustriais, pode contribuir para a redução de custos uma vez que o meio de cultivo, representa aproximadamente 30 % do valor do produto final do processo fermentativo (MAKKAR, CAMEOTRA, 1999).

O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos envolve a seleção de um substrato que contenha um balanço correto de nutrientes que

suportem tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse. (NISTCHKE, PASTORE, 2006). Outras desvantagens dos biossurfactantes estão envolvidas com a padronização e os custos com transportes, armazenagem e tratamento (MERCADDES, MANERSA, 1994).

Kosaric *et al.* (1983) sugeriram quatro fatores para redução dos custos na produção dos biossurfactantes: os microrganismos (seleção, adaptação ou aumentar o rendimento do produto); o processo (seleção, adaptação ou diminuir o capital e os custos com operação), o substrato (que propicie um maior crescimento microbiano) e a separação do produto (minimizar os resíduos da separação, como solventes utilizados na extração).

3.3.1 Classificação Química e Microrganismos Produtores de Biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados com base no seu maior grupo funcional ou de acordo com o microrganismo produtor (Tabela 1). Os maiores grupos incluem: glicolipídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, lipídios neutros, ácidos graxos e biossurfactantes poliméricos (BANAT *et al.* 2000).

Ron e Rosenberg (2001) preferem agrupar os biossurfactantes de acordo com o peso molecular, os de baixo peso molecular, reduzem eficientemente a tensão superficial e interfacial. No entanto, os polímeros de alto peso também podem ser considerados bioemulsificantes, porém são mais eficientes como agentes estabilizadores de emulsão, pois, se ligam fortemente a estruturas químicas presentes nas superfícies, estabilizando as emulsões óleo-água e água-óleo (MATSUURA, 2004). Esta é particularmente comum entre os microrganismos que degradam compostos hidrofóbicos insolúveis em água como o petróleo. Os bioemulsificantes são usados para melhorar a recuperação de óleo nos derramamentos no mar e na biorremediação de solos contaminados com óleos, além de apresentarem também atividade antimicrobiana como, por exemplo, a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* (TOREN *et al.*, 2002).

No grupo dos surfactantes naturais, de baixo peso molecular estão os glicolipídeos, lipopeptídeos e fosfolipídeos. Os biossurfactantes de alto peso molecular que atuam como dispersantes prevenindo a coalescência das gotas de óleo na água, e são produzidos por um grande número de espécies de bactérias de diferentes gêneros. Os poliméricos e particulados, estes, no entanto, não possuem necessariamente uma

porção hidrofílica e outra hidrofóbica na mesma molécula e sim por polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos de misturas desses biopolímeros (RON, ROSENBERG, 2001; ÚBEDA, 2004).

A maior parte dos biossurfactantes é do tipo aniônico ou neutro; mas, alguns são catiônicos, como, aqueles que contêm grupos amino. A parte hidrofóbica da molécula pode ser formada por ácidos graxos de cadeia longa, hidróxi-ácidos graxos ou por α -alquil- β -hidroxi ácidos graxos. A porção hidrofílica pode ser composta por carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos ou álcoois (JACOBUCCI, 2000).

O tipo de biossurfactante produzido por microrganismos é muito específico, podendo variar de espécie para espécie. Os microrganismos produtores de biossurfactantes pertencem aos mais variados gêneros microbianos, contudo a maioria deles é produzida por bactérias (DESAI, BANAT, 1997) (Tabela 1).

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos, microrganismos produtores e referenciais.

Classe	Biossurfactante	Microrganismo	Referencia
Baixo Peso Molecular	Glicolipídeos:		
	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BENINCASA <i>et al.</i> (2004)
	Soforolipídeos	<i>Candida bombicola</i> , <i>Candida apicola</i>	HOMMEL <i>et al.</i> (1994)
	Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	UCHIDA <i>et al.</i> (1989)
	Flavolipídeos:	<i>Flavobacterium</i> sp MTN11	BODOUR <i>et al.</i> (2004)
	Lipopeptídeos e lipoproteínas:		
	Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>	YAKIMOV <i>et al.</i> (1998)
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NEU <i>et al.</i> (1990)
	Surfactina,	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	CARILLO <i>et al.</i> (2003)
	Gramicidina S	<i>Bacillus brevis</i>	AZUMA & DEMAIN (1996)
	Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>	FALAGAS <i>et al.</i> (2005)
	Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos:		
	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i> , <i>Arthrobacter parafineus</i>	MAKKAR & CAMEOTRA (2002)
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>	MAKKAR & CAMEOTRA (2002)	
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	LEMKE <i>et al.</i> (1995)	
Alto Peso Molecular	Surfactantes poliméricos:		
	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ROSENBERG <i>et al.</i> (1993)
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ROSENBERG <i>et al.</i> (1988)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	CIRIGLIANO e CARMAN (1984)
	Manoproteína	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	CAMERON <i>et al.</i> (1988)
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	NAVON-VENEZIA <i>et al.</i> (1995)
	Surfatantes particulados:		
	Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DESAI e BANAT (1997)

Fonte: (LIMA, 2008)

Glicolipídeos: É o grupo dos biossurfactantes mais conhecidos, geralmente formados por ácidos graxos de cadeia longa ligada a um carboidrato por via ligação glicosídica. O carboidrato envolvido pode ser glicose, manose, galactose, ácido galacturônico ou raminose (HOLMBERG, 2001). Estas moléculas se encontram envolvidas na captação de hidrocarbonetos de baixo peso molecular por microrganismos. Dentre os glicolipídeos mais importantes estão os rhamnolipídeos (Figura 3), trealólipídeos e soforolipídeos (COSTA, 2005).

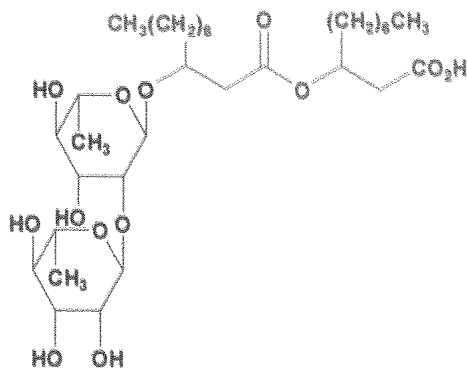


Figura 3. Rhamnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* (COSTA, 2005).

Ácidos Graxos, Fosfolipídeos e Lipídeos Neutros: Várias bactérias e leveduras produzem surfactantes que apresentam, em sua estrutura, ácidos graxos e fosfolipídeos quando crescidos em n-alcenos (MUTHUSAMY *et al.*, 2008). Esses surfactantes são capazes de formar microemulsões e diminuir a tensão superficial entre água e hexadecano, para valores inferiores a 1mN/m (CIRIGLIANO, CARMAM, 1985). Em culturas de *Acinetobacter sp.* a fosfatidiletolamina (Figura 4) é produzida, formando microemulsões de alcenos em água (COSTA, 2005).

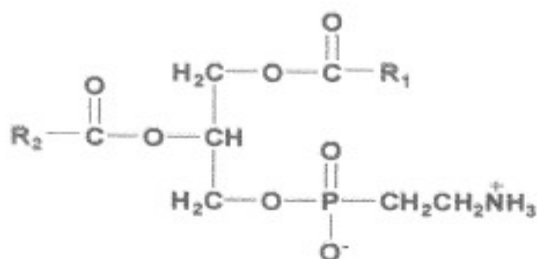


Figura 4. Fosfatidiletolamina, produzido por *Acinetobacter sp* (COSTA, 2005).

Os lipídeos neutros compreendem os ácidos graxos, triacilgliceróis e ácidos micólicos os quais, são sintetizados por espécies de *Mycobacterium spp* e por alguns gêneros de *Nocardia*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus* (COSTA, 2005).

Biossurfactantes Poliméricos: Os biossurfactantes poliméricos mais estudados são o emulsan (Figura 5), liposan, alasan, lipomanan e outros complexos proteína-polissacarídeo. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG -1 produz o emulsan, poderoso emulsificante extracelular, composto por uma cadeia de ácidos graxos ligado a um extenso esqueleto heteropolissacarídico e apresenta elevado peso molecular (ROSENBERG, RON, 1999). Este é um dos poucos surfactantes microbianos produzidos em maior escala (MULLIGAN, GIBBS, 1993). O liposan é um emulsificante extracelular, sintetizado por *Candida lipolytica* e é composto por 83% de carboidrato e 17% de proteína (GAUTAM, TYAGI, 2005). Cameron *et al.* (1988) estudaram a produção em grande quantidade de monoproteínas por *Saccharomyces cerevisiae*, as proteínas produzidas excelente atividade emulsificante em vários óleos, alcanos e solventes orgânicos.

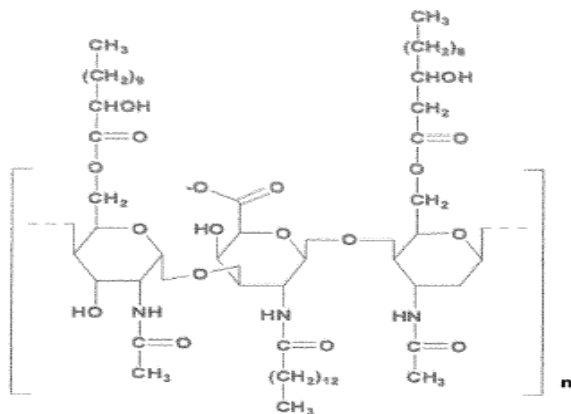


Figura 5. Estrutura do Emulsan, *Acinetobacter calcoaceticus* (COSTA, 2005).

Biossurfactantes Particulados: São vesículas extracelulares que apresentam hidrofobicidade, sendo assim, estão envolvidos na captação de alcanos para célula microbiana. Vesículas de *Acinetobacter sp.* linhagem HO1-N com um diâmetro de 20 a 50 nm e densidade de 1,158 g/cm³ são compostos de proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (GAUTAM, TYAGI, 2005). Outras espécies são *Cyanobacteria* e alguns patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Serratia sp.* (MUTHUSAMY *et tal.*, 2008).

Lipopeptídeos e Lipoproteínas: São compostos cíclicos resultantes da condensação entre um ácido graxo e um oligopeptídeo. Estes compostos apresentam atividade antibiótica como, a surfactina, gramicidinas e polimixinas e são produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* (MUTHUSAMY *et al.* 2008). A surfactina produzida por *Bacillus subtilis* consegue diminuir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m mesmo em baixas concentrações (MULLIGAN, 2004).

3.4 SURFACTINA

3.4.1 Histórico

Os primeiros trabalhos envolvendo a utilização de biossurfactantes datam de 1949, quando Jarvis e Johnson detectaram as atividades antibiótica e hemolítica de um rhamnolipídeo (BARROS, *et al.* 2007). Mas, foi em 1968 que Arima e colaboradores descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, o qual foi denominado de Surfactina, devido a sua excepcional atividade superficial, tendo, posteriormente, sua estrutura elucidada como um macrólido lipopeptídeo (KAKINUMA *et al.* 1969 apud PEYPOUX *et al.*, 1999).

Muito embora, outros lipopeptídeos tenham sido descobertos, a Surfactina continua a ser o principal representante da família e o mais estudado. As investigações sobre as suas ações fisiológicas ou bioquímicas mostraram sua ação inibidora na formação de coágulos de fibrina (ARIMA *et al.* 1968) e outras ações como agentes, antibacteriano, antitumoral e hipocolesterolêmicas (KAMEDA *et al.* 1972; IMAI *et al.* 1971 apud PEYPOUX *et al.*, 1999). Tais ações fisiológicas demonstraram que a Surfactina apresenta grande potencial de uso na medicina, mas, foi na década de 80 que os cientistas começaram a prestar atenção, neste biopolímeros, como uma alternativa atraente na substituição aos surfactantes sintéticos. E ainda, por causarem menores danos ao meio ambiente, produzidos por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*, além de serem obtidos por processos menos agressivos sob o ponto de vista ambiental e apresentarem efeitos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (CUBITTO *et al.* 2004), remoção de óleo em areia contaminada (MORÁN *et al.* 2000), formação de emulsões estáveis em óleo (RAZAFINDRALAMBO *et al.* 1998), bem como na degradação de pesticidas e biorremediação de solos altamente contaminados por zinco e cádmio (MULLIGAN *et al.* 1999).

Até a década de 90 a indústria petrolífera dominava o mercado dos biossurfactantes, mas a diversidade química dessas moléculas fornecia uma ampla variedade de compostos com propriedades específicas, permitindo assim, as aplicações e comercialização nos mais variados setores industriais (BARROS *et al.* 2007).

3.4.2 Estrutura Química

A Sufactina, que apresenta massa molecular de 1036 Da, é um lipopeptídeo cíclico anfipático, constituído por um heptapeptídeo (ELLVDLL) com a seqüência quiral LLDLLDÇ interligada, por uma ligação lactona, a uma cadeia ácido graxo β -hidroxi com comprimento que varia entre 12 a 16 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (figura 6) (KOWAL *et al.* 1998; HUE *et al.* 2001; BONMATIN *et al.* 2003).

Existem três tipos diferentes de surfactinas, denominadas de A, B e C, as quais são classificadas de acordo com as diferentes seqüências de aminoácidos presentes nas moléculas (SINGH, CAMEOTRA, 2004). Essas isoformas diferenciam-se ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia, à ligação do seu componente hidroxil ácido graxo e a substituições dos aminoácidos componentes do anel (KOWALL *et al.*, 1998).

Estas variações dependem da linhagem e condições nutricionais e ambientais oferecidas ao microrganismo, mais do que a determinação genética (BARROS *et al.* 2007). Moléculas de aminoácidos hidrofóbicos são localizadas nas posições 2, 3, 4, 6 e 7, enquanto resíduos de glutamyl e aspartil estão nas posições 1 e 5, respectivamente, o que torna a surfactina uma estrutura com duas cargas negativas (SEYDLOVÁ, SVOBODOVÁ, 2008).

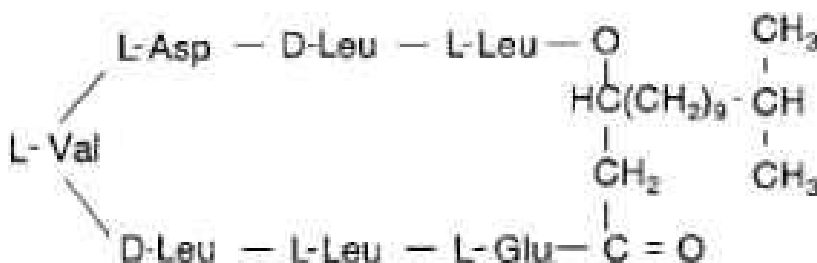


Figura 6. Estrutura da surfactina (DESAI, BANAT, 1997)

Na fase aquosa ou mesmo, na interface a água /ar, a surfactina adota uma estrutura denominada de β -folha, o que provavelmente é responsável pelo seu amplo espectro de atividades biológicas (figura 7). Tais atividades biológicas dependem tanto da composição de aminoácidos e da seqüência do peptídeo, como da natureza lipídica, que implicará em modificações da capacidade hemolítica, quelação de metais, CMC e atividade superficial (KOWALL *et al.* 1998, PEYPOUX *et al.* 1999; LANG, 2002).

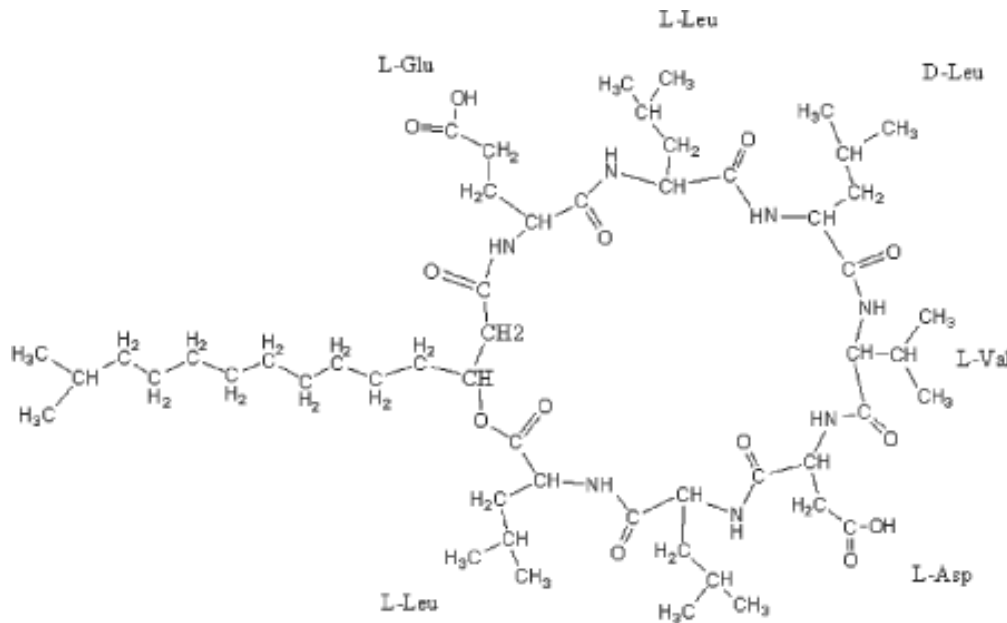


Figura 7. Estrutura da principal isoforma da surfactina, segundo Barros *et al.*, 2007.

Devido a sua estrutura complexa, muitas pesquisas estão voltadas para um melhor entendimento dessa biomolécula, e conseqüentemente elucidação do excepcional poder surfactante e das propriedades fisicoquímicas que caracterizam a Surfactina. Nesse contexto a pesquisa em torno das variadas seqüências de peptídeos torna-se promissora para síntese desses compostos em laboratório, o que já tem acontecido com sucesso (NAGAI *et al.* 1996).

3.4.3 Características Gerais de *Bacillus subtilis* e linhagens produtoras de Surfactina

A bactéria *Bacillus subtilis* é um bacilo gram positivo do solo, não patogênico, não colonizador de tecidos, naturalmente transformável (a capacidade de capturar DNA exógeno faz parte do seu ciclo de vida) e formador de esporos. Considerada modelo de estudo de bactérias gram-positivas, o conhecimento sobre suas características genéticas e fisiológicas só encontra paralelo com aquele disponível para a gram-negativa *Echerichia coli* K12 (PACCZ, 2007).

O gênero *Bacillus* é reconhecido por apresentar muitas espécies que produzem peptídeos com ação bactericida e fungicida. O *Bacillus subtilis* tem sido alvo de estudos bioquímicos durante várias décadas, e é considerado como um marco na pesquisas de bactérias produtoras de peptídeos antibacterianos, que apresentam amplo espectro de atividade (SONENSHEIN, *et al.*, 2003)

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

Ferrarezo (1998) isolou duas linhagens de *Bacillus sp* a partir de efluente bruto de indústria de produção de margarina e sabão, e os denominou B1 e B9, os quais apresentaram alto índice de emulsificação quando cultivados em GYP. Os biossurfactantes produzidos por estes microrganismos foram capazes de emulsionar compostos aromáticos, como xileno, tolueno e misturas de compostos alifáticos e cíclicos, como querosene e diesel, além de triglicerídeos (óleo de soja). A linhagem de *Bacillus sp* B1 reduziu a DQO em 58%, após 48h de cultivo e a linhagem *Bacillus sp* B9 reduziu a DQO em 63,66%, após 96h de cultivo no mesmo efluente, indicando grande potencial para o tratamento de efluentes e biorremediação.

Neste sentido, a tabela 2 apresenta as linhagens das bactérias produtoras de Surfactina, os meios de produção e a bibliografia relacionada.

Tabela. 2. Microrganismos produtores de surfactina, meios de produção e bibliografia.

Linhagens de <i>Bacillus subtilis</i>	Meios	Rendimento de Surfactina (g/L)	Referencias
IAM 1213	Caldo Nutriente	0,1	Arima <i>et al.</i> (1968)
ATCC 21332	Meio de Micronutrientes (sais) com Glicose	0,8	Cooper <i>et al.</i> (1981)
ATCC 21332	Turfa Hidrolisada	0,14 g/g açúcar	Sheppard e Mulligan (1987)
ATCC 51338 (Mutante UV)	Meio de Micronutrientes (sais) com Glicose	1,1	De Roubin <i>et al.</i> (1989)
S 499	Meio Landy's	0,76	Sandrin <i>et al.</i> (1990)
RB 14	Polipeptona/Glicose	0,25	Ohno <i>et al.</i> (1992)
MI 113 (recombinante)	Resíduo Okara	2,0 g/Kg	Ohno <i>et al.</i> (1995)
C9 (KCTC 8701P)	Meio de Micronutrientes (sais) com Glicose e Limitação de Oxigênio	7,0	Kim <i>et al.</i> (1997)
ATCC 21332	Meio de Micronutrientes (sais) e Glicose com adição de Ferro	3,5	Wei e Chu (1998)
ATCC 21332	Glicose com oxigênio e limitação de Nitrogênio	0,44	Davis <i>et al.</i> (1999)
ATCC 21332	Amido Purificado	0,154 g/g de amido	Fox e Bala (2000)
ATCC 21332	Meio de Micronutrientes (sais) com Sacarose	1,23	Makkar e Cameotra (2002)
ATCC 21332	Meio de Micronutrientes (sais) enriquecido com Manganês	2,6	Wei e Chu (2002)
BBK-1	Meio LBGS com diferentes concentrações de NaCl	0,4	Roongsawang <i>et al.</i> (2002).
O9	Meio de Micronutrientes (sais) com Sacarose	0,8	Morán <i>et al.</i> (2002)
ATCC 21332	Meio Minino de Micronutrientes (sais) enriquecido com ferro.	3,0	Wei <i>et al.</i> (2004).
ATCC 21332	Meio Mineral enriquecido com sólidos carreadores.	3,6	Yen <i>et al.</i> (2005).
R14	Meio Definido	2,0	Fernandes <i>et al.</i> (2007).
HSO121	Meio Mineral de Micronutrientes (sais)	1,8	Haddad <i>et al.</i> (2008).
MUV4	Mackeen Modificado	0,652	Suwansukho <i>et al.</i> (2008)
LB5a	Resíduo agroindustrial (manipueira)	2,4	Barros e Pastore, (2008).

Fonte: Mulligan e Gibbs (2004) modificada.

3.4.4 Propriedades e Aplicação da Surfactina

Na Medicina

Os Lipopeptídeos podem atuar como antibióticos, agentes antivirais e antitumorais, imunomoduladores ou inibidores específicos de toxinas e enzimas, contudo, o modo de ação desses compostos ainda não foi totalmente esclarecido, embora seja provável que as suas propriedades de atividade de superfície e de membrana desempenham um importante papel (MAKKAR, CAMEOTRA, 2004).

Vollenbroich *et al.*, (1997) estudaram a atividade antiviral da surfactina e comprovaram sua eficácia em diferentes vírus, como o “Semliki Forest Vírus” (SFV-1), herpes simples vírus (HSV-1 e HSV-2), “suid herpes virus” (SHV-1), “vesicular stomatitis virus” (VSV), “simian immunodeficiency virus” (SIV), “feline calicivirus” (FCV), “marine encephalomyocarditis virus” (EMCV). A eficiência da surfactina é devido à ruptura parcial da membrana lipídica e capsídeo do vírus, através da interação da ação surfactante com a membrana lipídica do vírus. Os estudos concluíram que a surfactina poderá ser utilizada na produção de insumos farmacêuticos e biotecnológicos altamente seguros quanto à contaminação por vírus.

A surfactina é um dos biossurfactantes mais conhecidos pela sua propriedade antimicrobiana. Bechard *et al.*, (1998) isolaram um lipopeptídeo antimicrobiano a partir de uma linhagem *Bacillus subtilis* isolada de maçãs. Este lipopeptídeo apresentou grande atividade antimicrobiana em diversas espécies de bactérias gram-negativas, porém, baixa atividade em gram-positivas no fungo filamentos *Penicillium expansum*. Estudos mostram que a Surfactina age como inibidora da formação de coágulos de fibrina; induz formação de canais iônicos em membranas da bicamada lipídica; inibe a adenosina monofosfato cíclico (cAMP); e ainda, inibe a fosfolipase citosólica do baço A2 (PLA2) (KIM, *et al.*, 1997) e exibe atividade antitumoral combatendo células neoplásicas malignas tipo carcinoma Ehrlich, devido a capacidade de atingir o interior da célula, promovendo a ruptura da membrana plasmática (PEYPOUX *et al.*, 1999). A surfactina apresenta também atividade antiproliferativa em experimentos com células de câncer de ovário, renal, de próstata, de cólon, de pulmão, de mama, de mama residente e melanoma; atividade citostática e citotóxica em todos os carcinomas investigados (COSTA, 2005).

Surfactina também tem propriedades anti-micoplasma e tem sido utilizado em um método simples e rápido para completar a permanente inativação de micoplasmas em

monocamadas e suspensão de células de culturas de mamíferos (VOLLENBROICH, *et al.*, 1997).

No Ambiente

A surfactina produzida por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*, além de serem obtidos por processos menos agressivos sob o ponto de vista ambiental, apresentaram efeitos significativos na biodegradação de compostos alifáticos e aromáticos. Makkar e Cameotra (1997) utilizando duas cepas termofílicas de *Bacillus subtilis* MTCC 1427 e MTCC 1423 produziram surfactina com capacidade de recuperação de óleo de 34 e 38,46%, respectivamente indicando potencial aplicação da surfactina na (MEOR) Recuperação Melhorada de Petróleo.

Morán *et al.* (2000) produziram surfactina a partir da linhagem de *Bacillus subtilis* O9 em meio contendo sacarose como fonte de carbono. A surfactina foi usada no estudo da degradação de resíduos de hidrocarbonetos por uma comunidade microbiana indígena. Os autores observaram, que a maior concentração micelar crítica ocorreu um aumento da degradação de hidrocarbonetos alifáticos de 20,9 para 35,5 % e no caso dos hidrocarbonetos aromáticos, aumentou de zero para 1%, comparada com a cultura sem biossurfactantes.

Cubitto *et al.*, (2004) avaliaram a aplicação da surfactina na biorremediação de solo contaminado por óleo cru. As análises foram feitas em solos microcosmos em condições laboratoriais. Os autores verificaram que a surfactina não afetou a degradação de hidrocarbonetos pela população microbiana e as concentrações de 19 e 19,5 mg de surfactina, por quilograma de solo, estimulou o crescimento da população envolvida no processo de degradação, acelerando a degradação dos hidrocarbonetos alifáticos. Porém, não houve estímulo para degradação dos hidrocarbonetos aromáticos.

Costa (2005) produziu surfactina com estabilidade á temperatura de 100°C por 2h, 121°C por 0,5 h 135 °C por 1h, pH de 6 a 12, e concentrações salinas de 15% de NaCl, apresentando capacidade de formar emulsões estáveis em óleos vegetais, hidrocarbonetos e combustíveis. Desta forma, demonstraram o potencial de utilização na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) e em biorremediação, avaliando a remoção de óleo bruto em areias contaminadas.

Lima (2008) avaliando as propriedades físico-químicas da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* LBBMA 155, evidenciou que a alta atividade emulsificante em petróleo, contendo tolueno, hexano, querosene, e hexadecano, sendo que as emulsões se

mantiveram estáveis com petróleo (82,74%) e querosene (74,00%) após 48h. Este surfactante apresentou-se estável na faixa de temperatura de 20-70°C de temperatura, contendo 5% de NaCl. O que torna o biossurfactante adequado para futuras aplicações ambientais.

3.4.5 Produção de Surfactina

A razão pela qual os microrganismos produzem surfactantes não está totalmente elucidada. Linhagens de *Bacillus subtilis* produtoras de surfactantes têm a produção inibida na presença de hidrocarbonetos, algum tipo de mecanismo repressor é ativado na presença de compostos hidrofóbicos (SANDRIN *et al.*, 1999).

A biosíntese do lipopeptídeo Surfactina é uma propriedade dos membros do gênero *Bacillus*, entretanto, os altos custos de produção e os baixos rendimentos envolvendo a produção de surfactina e de outros biossurfactantes limitam suas aplicações (BANAT *et al.*, 2000 apud YEH *et al.*, 2005).

Sabendo-se das propriedades destes compostos e da importância que estes assumem nas mais variadas áreas de aplicações, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a obtenção destas moléculas de forma economicamente viável, possibilitando assim a competição com os surfactantes sintéticos (COSTA, 2005). Isso levou ao desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a utilização de substratos de baixo custo para a produção e otimização dos processos fermentativos, e redução de gastos para poder suprir a demanda de surfactina (YEH *et al.* 2005; COSTA, 2005).

Os fatores que influenciam a síntese de surfactina por microrganismos do gênero *Bacillus* dependem da natureza do substrato, à concentração de íons nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês presentes na composição do meio de cultura (KARANTH, *et al.* 1999), assim como pelas condições ambientais (DESAI, BANAT, 1997). As condições de crescimento como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfactantes, dado o seu efeito sobre o crescimento e atividades celulares (DESAI, BANAT, 1997).

Fonseca *et al.* (2007) estimularam a produção de surfactina pela linhagem de *Bacillus subtilis* YRE207 em meio contendo açúcar cristal (sacarose) como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio como NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, uréia em resíduo de fábrica de cerveja. Assim, os resultados obtidos indicaram uma maior redução da tensão

superficial e produção de surfactina com o nitrato de amônia como fonte de nitrogênio, demonstrando assim a influência da fonte de nitrogênio na síntese de surfactina.

Estudos de requerimentos com micronutrientes (sais) minerais estabeleceram claramente o efeito estimulatório do ferro manganês na biosíntese de surfactina (COOPER *et al.* 1981). Wei *et al.* (2004) obtiveram um aumento dez vezes maior na produção de surfactina com a adição de Fe^{2+} no meio de cultura. Os mesmos autores em (2002) conseguiram um aumento de 0.33 gL^{-1} para 2.6 gL^{-1} na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC21332 em meio mineral com glicose e $0,01\text{mM}$ de Mn^{2+} , no entanto, observaram que o rendimento é maior do que a maioria dos valores apresentados, quando foram utilizadas linhagens geneticamente modificadas.

Yeh *et al.* (2005) propuseram uma estratégia de fermentação usando carreadores sólidos (carbono ativado, carbono expandido e ágar) no meio de produção por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Os resultados mostraram que a o meio contendo 25g/L^{-1} de carbono ativado resultou em uma produção ótima de surfactina de 3600mg/L^{-1} , o qual foi aproximadamente 36 vezes maior que o resultado obtido com carreadores livres na cultura líquida.

Na produção de surfactina por *B. subtilis* a transferência de oxigênio é também parâmetro chave para a otimização e ampliação de escala de produção do composto (SHEPPARD, COOPER, 1990).

Portanto, a melhor forma de estimular uma boa produção de surfactante é a combinação de fatores físico-químicos que dão os maiores rendimentos. Ao contrário de muitos metabólitos secundários de *Bacillus*, os quais são induzidos quando as células têm esgotado um ou mais nutrientes essenciais, a produção da surfactina é induzida pela crescente atividade das células na fase imediatamente pós-exponencial (VATER 1986 apud PEYPOUX *et al.* 1999). Portanto, a competição com o crescimento celular é provavelmente uma das razões para o pouco rendimento do produto.

3.4.5.1 Substratos Não – Convencionais na Produção de Surfactina

O sucesso da produção de um biossurfactante depende do desenvolvimento de processos mais econômicos e o uso de matérias - primas de baixo custo, que representam 10-30% do custo total da produção (CAMEOTRA, MAKKAR 1998).

Milhões de toneladas de resíduos perigosos ou não, são gerados anualmente em todo o mundo. Os custos no tratamento e eliminação desses resíduos são considerados

muito altos para diversas indústrias e poderá, em breve, exceder os recursos disponíveis. Assim, existe uma grande necessidade de uma melhor gestão destes resíduos, através dos conceitos: reduzir, reutilizar e reciclar. Investigações sobre a seleção de substratos adequados principalmente, sobre resíduos tropicais e de origem agroindustrial (MAKKAR, CAMEOTRA, 2002).

Tais experimentos utilizam culturas incluem a mandioca, soja, açúcar, beterraba, batata doce, batata, sorgo doce, e restos vegetais, como farelo e palha de trigo e de arroz, casca de soja, milho e arroz, bagaço de cana e mandioca, resíduos das indústrias de processamento de café, a polpa do café, cascas de café; resíduos das indústrias transformadoras de frutas tais como o bagaço de maçã e de uva, resíduos do processamento de abacaxi e cenoura, resíduos de banana; resíduos de fabricas de processamento de óleo, como bolo de coco, torta de soja, bolo de amendoim, resíduos de fábricas de farinha; e outros, tais como serragem, sabugos de milho, resíduos de chá, chicória (PANDEY *et al.* 2000). No entanto, a seleção do resíduo como substrato envolve o problema de encontrar um bom equilíbrio nas fontes de carboidratos e lipídios para um crescimento ótimo do microrganismo e estimular a produção do biossurfactante (MAKKAR, CAMEOTRA, 1999b).

Substratos adicionais têm sido sugeridos para produção de biossurfactante, especialmente os resíduos miscíveis em água como, melação, soro de leite ou resíduos de destilaria (DANIEL *et al.* 1998; MAKKAR, CAMEOTRA, 1999b).

Os efluentes do processamento de batatas caracterizam-se como potenciais substratos não-convencionais, pois são compostos contendo 80% de água, 17% de carboidratos, 2% de proteínas, 0,1% de gordura e 0,9% de vitaminas, minerais inorgânicos e elementos traços de micronutrientes. Fox e Bala (2000) investigaram a produção de surfactina por linhagem de *Bacillus subtilis* ATCC21332 com o uso de meio contendo efluentes sólidos do processamento de batata e obtiveram uma redução da tensão superficial da água de 71,3 para 28,3 mN/m.

Nitschke e Pastore (2004) utilizando a manipueira, resíduo do processamento da mandioca, como fonte de carbono para produção de surfactina por duas linhagens de *Bacillus subtilis* LB5a e ATCC 21332. Observaram uma redução da tensão superficial de 49,5 para 26,6 e 25,9 mN/m, respectivamente. E ainda, a concentração bruta obtida do surfactante foi de 3,0 g/L e 2,2 g/L, respectivamente.

O melação é um subproduto do açúcar e possui um baixo preço, em relação a outras fontes de açúcar, além de ser rico em diversos nutrientes. Makkar e Cameotra (1997) trabalhando com melação como fonte de carbono, na produção de surfactina por duas linhagens termofílicas de *Bacillus subtilis*, obtiveram uma redução da tensão superficial de 29 e 31 dynes/cm. Mawgoud *et al.* (2008), otimizaram a produção da surfactina com

a linhagem *Bacillus subtilis* BS5 utilizando um meio mineral suplementado com melaço como fonte de carbono e NaNO_3 , como fonte de nitrogênio e alguns elementos traços e obtiveram uma produtividade de surfactina de 1.12 g/L.

Os efluentes provenientes das indústrias leiteiras são considerados bons substratos para produção de biossurfactante. O soro de leite, por exemplo, é composto por altos níveis de lactose (75% da matéria seca), 12-14% de proteínas, ácidos orgânicos e vitaminas. O descarte do soro de leite é um grande problema de poluição para os países de economia leiteira (DUBEY, JUWARKAR, 2001).

O farelo de arroz integral é oriundo do processo de polimento dos grãos de arroz, quando são removidas as cascas do pericarpo e tegumento, além de partículas remanescentes da casca, normalmente acrescenta-se o “brunido”, constituído da porção amilácea interna e da camada aleurona e chega a possuir 20% de lipídeos (EMBRAPA, 1985).

Ohno *et al.* (1992 e 1995) relataram a produção Surfactina por uma cepa de *B. subtilis* NB 22 usando farelo de trigo e Okara (resíduo do requeijão de soja). Okara, é um resíduo do processo de fabricação de tofu (água 81,1%; proteínas 4,8%; gordura 3,6%;, amido e açúcar 6,4%; fibra 3,3% e cinzas 0,8%).

O processo produtivo da surfactina ainda não está bem elucidado para aplicação direta em escala industrial, sendo os fatores econômicos as principais barreiras (BARROS *et al.* 2007). Deste modo a utilização de substratos não convencionais é, sem dúvida, uma alternativa importante para produção de biossurfactante, na busca de uma produção em larga escala. .

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2002. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: Argos, 2002. p.189.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and Iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobic. **Enzyme and Microbial Technology**, [New](#) York, v. 27, n.10, p.749-754, Dec. 2000.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G.. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.31, p.488-494, 1968.

AZEVEDO, N. *et al.* Pesquisa científica e inovação tecnológica: a via brasileira da tecnologia. **Revista de ciências sociais**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p.139-176, 2002.

AZUMA, T.; DEMAIN, A.L. Interactions between *gramicidin S* and its producer, *Bacillus brevis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.17, n. 1, p.56-61, Apr 1996.

BANAT, I.M. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced oil Recovery and oil pollution Remediation: a Review. **Bioresource Technology**, New York, v. 51, n. 1, p.1-12. 1995.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.53, n. 5, p.465-508, 2000.

BARNUM, S. *Biotechnology: an Introduction*. Wadsworth Publishing Company – Beolmont. 225 p. 1998.

BARROS, F.F.C. *et al.* Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v.30, n.2, p.409-414. 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/30.pdf>.> Acesso em: 30 04 08.

BARROS, F.F.C.; PONEZI, A.N.; PASTORE, G.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.35, n. 9, p.1071–1078, jul 2008.

BECHARD, J. *et al.* Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.46, n. 12, p.5355-5361, Nov 1998.

BENINCASA, M. *et al.* Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.85, n. 1, p.1-8, 2004.

BERTRAND, J. C. *et al.* The potential application of biosurfactants in combating hydrocarbon pollution in marine environments. **Research in Microbiology**, Paris, v. 145, n.1, p. 5 1994.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.152, n. 1-2, p. 41-52, July 1999.

BONMATIN J.M., LAPRÉVOTE O., PEYPOUX F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. **Journal of Combinatorial chemistry & high throughput screening**, Washington, v.6, n. 6, p.541-556, Sept. 2003.

BODOUR, A.A., *et al.* Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n. 1, p.114-120, Jan 2004.

BUENO, Messias Silva. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 92f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas da universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campos de São José do Rio Preto, SP, 2008.

BULL, A. T.; MARRS, B.L.; KURANE, R. Biotechnology for clean industrial products and processes. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v.2, n. 3, p. 246-251, June 1999.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.64, n.3, p.573–606, Sept 2000.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme condition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.50, n. 5, p.520-529, Aug 1998.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v.7, n. 3, p.262–266, June 2004.

CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of the *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 54, n. 6, p.1420-1425, June 1988.

CARILLLO, C. *et al.* 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1611, n. 1-2, p. 91-97, Apr 2003.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAM, G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier form *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.50, n.4, p.846-850, Oct 1985.

COMCIÊNCIA. Biodiversidade: valor econômico e valor social. col. 22- junho de 2001. Revista Eletrônica de jornalismo científico (www.comciencia.br). 2001.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; DENIS, C. Surface active properties of a biosurfactant from *Corynebacterium lepus*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.58, n.1, p. 77-80, Jan 1981.

COOPER, D.G. *et al.* Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.42, p.408-412, 1981.

COSTA, GISELLE APARECIDA NOBRE. **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. 2005. 86f. Dissertação (Mestre) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

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

CUBITTO, M.A. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.15, p.281- 287, 2004.

DANIEL, H.J.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.20, p.1153–1156, 1998.

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

De-ROUBIN, M.R.; MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa. v. 35, n.9, p.854-859, 1989.

DESAI, J.D.; BANAT, J.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p. 47-67, 1997.

DOMIRACI PACCEZ, Juliano. **Aplicação de linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento de vacinas de mucosas contra patógenos entéricos**. 2007. 91p. Tese (Doutorado Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Basingstoke, v.17,p. 61-69, 2001.

EMBRAPA. **Tabelas de composição química e energética de alimentos para aves e suínos**. 2.ed. Concórdia, SC :CNPISA, 1985. 29p.

FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K.; COLISTIN. 2005. The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.40, p.1333-1341, 2005.

FERNANDES, P.A.V. *et al.* Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p.704-709, 2007.

FERRAREZO, E.M., **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão**. 1998. Dissertação (Mestre) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

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

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

FRANCY D.S. *et al.* Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Indian of Journal Microbiology**, Mumbai, v. 8, n. 4, p. 237-246, 1991.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Caderno de Saúde Publica**, Rio de Janeiro, v.11, n.3, p.495-500, 1995.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K., Microbial surfactants: A review. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 55, p.155-166, 2005.

HABA, E. *et al.* Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, V. 88, n. 3, Ma, p. 379-387, 2000.

HADDAD, N.I.A. *et al.* Surfactin isoforms from *Bacillus subtilis* HSO121: separation and characterization. **Protein & Peptide Letters**, Holanda, v.15, p.265-269, 2008.

HOLMBERG, K.; Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, London, v.6, p. 148–159, 2001.

HOMMEL, R.K.*et al.* Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (torulopsis) apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.42,p.192-197, 1994.

IMAI, Y. *et al.* Hypercholesterolemia effect of surfactin, a novel bacterial peptide lipid. **Takeda Kenkyusho Ho**, Tokyo, v.30, p.728-734, 1971.

JACOBUCCI, D.F.C. **Estudo da influencia de biosurfactantes na biorremediação**. Tese (Doutorado) – UNICAMP, Campinas, 2000.

JACQUES BOLNER DE LIMA, Cristian. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. 2007. 190p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2007.

KAKINUMA A. *et al.* Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipids surfactant produced by *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 33, p.971–997, 1969.

KANTIN, R. Poluição aquática por detergentes: aspectos gerais. Rio de Janeiro:**Engenharia Sanitária**, v. 19, n. 1, p. 82-85, 1980.

KAMEDA, Y. *et al.* Antitumor activity of *Bacillus natto*. III. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 1126. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 20, p.1551-1553, 1972.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, Bangalore, v.77, n.1, p.116-126, 1999.

KATE, T. K.; LAIRD, S. A. 1999. The commercial use of biodiversity. Earthscan Publications Ltd., London, U.K.

KIM, H.S. *et al.* Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.84, p.41-46, 1997.

Kibroninc <: www.kibron.com/.../Science/micellization.gif>, Acessado em: 10 de Março de 2009.

KIM, H.S. *et al.* Purification of biosurfactants from *Nocardia sp.* L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.31, p.249-253, 2000.

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

KOSARIC, N.; GRAY, N.C.C. & CAIRNS, W.L. Biosurfactants and Biotechnology, **Surfactant Science Series**. Marcel Dekker. New York .v. 25, p.1-19, 1983.

KOWALL, M. *et al.* Separation and characterization of surfactin isoformas produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of colloid and interface science**, New York, v. 204, p.1-11, 1998.

LANG, S.; PHILP, J.C. Surface-active lipids in rhodococci. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.74, p. 59-70, 1998.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants) **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, New York, v. 7, n.1-2, p.12-20, 2002.

LEMKE, M.J.; CHURCHILL, P.F.; WETZEL, R.G. Effect of substrate and cell surface hydrophobicity on phosphate utilization in bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.913-919, 1995.

LICHTENBERG, D., ROBSON, R.J. E DENNIS, E.A., Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. **Biochemistry Biophysical Acta**, Amsterdam, v.737, p.285-304, 1983.

MARIA DA SILVA LIMA, TÂNIA. **Determinação Estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remediação de fenantreno e cádmio de solo**. 2008. 172p. Tese (Doutorado Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 14, n. 7, p.887-889, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. **Journal of Surfactants and Detergents**, Germany, v.2, p.371–376, 1999a.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant Production by Microorganisms on Unconventional Carbon Sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, Germany, v. 2, n. 2, p.237-241, 1999b.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, Germany, v.5, p.11-17, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 7, p. 262, 2004.

MATSUURA, ANI BEATRIZ JACKISCH. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 2004. 98f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MAWGOUD, A.M.A.; ABOULWABA, M.M; HASSOUNA, N.A.H. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.150, p.305-325, 2008.

Mechleans <<http://mechleans.com/content/what-surfactant> > Acessado em: 10 de Março de 2009.

MEIRA, JOEL ALEXANDRE. **Produção de biossurfactante por Fermentação no Estado Sólido e Desenvolvimento de Aplicações para Tratamento de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos**. 2007. 94f. Dissertação (Mestre em Química) - Faculdade de Ciências Exatas, Universidade do Paraná, Curitiba, 2007.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.71, n.1, p.61-64, 1994.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. 108f. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MORIKAWA, M.; YOSHIHIKO, H.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1488, p.211-218, 2000.

MORÁN, A.C. *et al.* Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, Dordrecht, v.11, p.65-71, 2000.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, p.509-515, 2006.

MULLIGAN, C.N.; CHOW, T.Y.K.; GIBBS, B.F. Enhanced biosurfactant production by mutant *Bacillus subtilis* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.31, p.486-489, 1989.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F.; Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. **Environmental Science & Technology**, Easton, v.33, p.3812-3820, 1999

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: **Biosurfactants: production, properties, applications**. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, 392-371, 1993.

MULLIGAN, C. N. Environment applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, Barking, v.133, p.183-198, 2004.

MULLIGAN, C.N. GIBBS, B.F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proceedings of the Indian National Science Academy**. B70, Mumbai, n. 14, p. 31-55, 2004.

MUTHUSAMY, M. *et al.* Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, Bangalore, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008

NAGAI, S. *et al.* (1996) Study on surfactin, a cyclic depsipeptide. 2. Synthesis of surfactin B2 produced by *Bacillus natto* KMD 2311. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 44, p.5-10, 1996.

NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p.3240-3244, 1995.

NEU, T.R.; HAERTNER, T; PORALLA, K. Surface active properties of viscosin: A peptidolipid antibiotic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 32, p.518-520, 1990.

NISSEN, E. *et al.* Application of surfactin for mycoplasma inactivation in virus stocks. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, Columbia, v. 33, p.414-41, 1997.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v.25, p.772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactant production by *B. subtilis* using cassava-processing effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.112, p.163-172, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, New York, V. 97, n. 2, p. 336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; COSTA S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules. **Biotechnology Progress**, New York, v.21, n.6, p. 15-93-1600, 2008.

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

NOUDEH, G.D.; HOUSAINDOKHT, M. BAZZAZ, B.S.F. Isolation, characterization and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. **The Journal of Microbiology**. Seoul, V.43, n. 3, 273-276, 2005.

OHNO, A.; TAKASHI, A.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, .14, p.1165-1168, 1992.

OHNO, A.; TAKASHI, A.; SHODA, M. Production of Lipopeptide Antibiotic Surfactin by Recombinant *Bacillus subtilis* in Solid State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 47, p.209-213, 1995.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A. New developments in solid-state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v.35, n.1153–1169, 2000.

PARRA, J.L. *et al.* Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.66, p.141-145, 1989.

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

PIRÔLLO, MARIA PAULA SANTOS. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2006.

POREMBA, k. *et al.* Toxicity testing of synthetic and biogenic surfactants on marine microorganisms. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v.6, p.157-163, 1991.

PORTER, M.R. Handbook of surfactants. New York: Chapman & Hall, 2^a ed., 1994.

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

RAZAFINDRALAMBO, H. *et al.* Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: effect of lipid and peptide structural attributes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 46, p. 911-916, 1998.

ROCHA, J.M.S. Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, v.3, p.5-11, 1999.

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation médium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Holanda, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Minireview: natural roles of biosurfactantes. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.3, n.4, p.229-236, 2001.

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

ROSENBERG, E. *et al.* Exploiting microbial growth on hydrocarbon – new markets. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v.11, p.419-424, 1993.

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

ROSTAGNO, HS. Tabelas brasileiras para aves e suínos - Composição de alimentos e exigências nutricionais. **COPASUL**, Viçosa, Minas Gerais, 141p. 2000.

SANTOS, A. S. **Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa***. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Co-production of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v.12, p. 370-375, 1990.

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

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, Poland, v.3, n. 2, p.123-133, 2008.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. **Indian Journal of Microbiology**, Mumbai, vol. 35, no. 3, p. 165-184, 1995.

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

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

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

SHEPPARD, J.D.; COOPER, D.G. The effect of biosurfactant on oxygen transfer in acyclone column reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester Sussex, v.48, p.325- 336, 1990.

SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. 2003. *Bacillus subtilis* and its closest relatives. From Genes to Cells. **America Society for Microbiology Press**. Washington. DC.

SOO, E.T. *et al.* Response surface methodological study on lipase – catalyzed synthesis of amino acid surfactants. **Process Biochemistry**, London, v.39, 1511-1518, 2004.

STRELEC, Tatiana. **Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes Ramnolípídeos e polihidroxicanoatos a avaliação da relação metabólica no processo de síntese**. 2006. 120f. Dissertação (Mestre) – Interunidades em Biotecnologia USP-IPT-I. Butantan da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SUN, L. *et al.* Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Holanda, v. 22, n. 12, p.1259-1266, 2006.

SUWANSUKHO, P.; RUKACHISIRIKUL, V.; KAWAI, F.; KITTIKUN, A.H. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v.30, p.87-93, 2008.

ÚBEDA, BEATRIZ TORSANI. **Estudo da produção de biossurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila***. 2004. 99f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

UCHIDA, Y. *et al.* Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.53, p.757-763, 1989.

VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid and Polymer Science**, Germany, v.72, p.12-18, 1986.

VELIKONJA, J.; KOSARIC, N. Biosurfactants in food applications. In Kosaric, N. (Ed), **Biosurfactants: production, properties and applications**, p. 419-446. New York: Marcel Dekker.

VOLLENBROICH, D. *et al.* Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, London, v. 25, p.289-297, 1997.

VOLLENBROICH, D. et al. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 1, p.44-99, 1997.

WASCHECK, R.C. et al. Substituição do milho grão triturado por farelo de arroz parboilizado na dieta de vacas leiteiras: consumo e digestibilidade aparente. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v.9, n.4, p.867-873, 2008.

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

WEI, Y.H.; CHU, I.M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, p. 479-482, 2002.

WEI, Y. H. et al. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 96, p.174-178, 2003.

WEI, Y. H.; WANG, L.F.; CHANG, J. S. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, New York, v.20, p.976-683, 2004.

WEI, Q.F.; HUANG, F.L.; MATHER, R.R.; FOTHERINGHAM, A.F. Factorial design evaluation of oil removal from fibrous sorbents by biosurfactant. **Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP**, Edinburgh, v. 62, N. 3, p. 407-413, 2007.

YAKIMOV, M.M. et al. A putative lichenysin A synthetase operon in *Bacillus licheniformis*: initial characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, n. 1399, p.141–153, 1998.

YEN, M.S.; HONG, Y.; CHANG, J.S. Enhanced production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, New York, v.21, p.1329-1334, 2005.

CAPÍTULO 2

Artigo

Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* UCP 0999 em Fermentação Submersa utilizando Substratos Agroindustriais, como Meios Alternativos

Manuscrito a ser submetido para publicação
Journal Industrial Microbiology and Biotechnology

Produção de Surfactina por *Bacillus subtilis* UCP 0999 em Fermentação Submersa utilizando Substratos Agroindustriais, como Meios Alternativos

Leonila Maria Leandro Acioly, Leonie Asfora Sarubbo e Galba Maria de Campos Takaki

¹Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, ²Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), CEP 50050-590 Recife-Pernambuco-Brasil.

Resumo

No presente trabalho foram avaliadas fontes agroindustriais, farinha da palha de arroz (*Oryza sativa*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*) e grãos de soja (*Sorghum vulgare*) para formulação de meios líquido para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* UCP 0999. Os meios foram suplementados com (2g/L) de peptona, (2g/L) de sulfato de amônia e (0,01mL/L) de micro nutrientes, mantidos sob agitação orbital de 200rpm, à temperatura de 30°C, por 72 h. O biossurfactante produzido no meio contendo farinha da palha de arroz suplementado com peptona, reduziu a tensão superficial da água 72 mN/m para 37,29 mN/m. Por outro lado, os meios de batata e grãos de soja suplementados com micro nutrientes produziram 2,481 e 3,357 mg/L, respectivamente, de biossurfactantes. Nos mesmos meios com a adição de micro nutrientes foram observados altos índices de emulsificação com óleo de motor, querosene e diesel, sugerindo utilização na remoção de poluentes hidrofóbicos. A espectroscopia ao raio infravermelho e luz ultra violeta sugeriram que os biossurfactantes produzido por *B. subtilis* nos diferentes substratos agroindustriais é surfactina. Dentre os meios formulados para produção de biossurfactantes, destacou-se, a farinha da palha de arroz suplementado com peptona, por apresentar menor tensão superficial.

Palavras-chaves: Surfactina, *Bacillus subtilis*, Fermentação Submersa, Substratos agroindustriais

Correspondência para: G.M. Campos-Takaki , Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526, Boa vista, 50.050-900 Recife, Pernambuco , Brasil.

1. Introdução

Os biossurfactantes são compostos anfifílicos produzidos, principalmente, através do crescimento aeróbio de microrganismos em meio aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras, ou mesmo misturas destes, como substratos. Quando são excretados para o meio de cultivo durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e na translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999). No entanto, alguns microrganismos produzem biossurfactantes associados à parede celular, facilitando a entrada de hidrocarbonetos no espaço periplasmático (PEYPOUX et al., 1999).

Estes compostos são considerados um grupo estruturalmente diverso de moléculas sintetizadas por microrganismos, sendo classificados de acordo com a sua natureza química e origem microbiana. As principais classes de biossurfactantes incluem: glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI e BANAT, 1997).

A surfactina, um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* é um dos mais potentes biossurfactantes descritos pela literatura (NITSCHKE, 2004). Segundo Barros et al., (2007) a CMC da surfactina em água é de 25 mg.L⁻¹, a tensão superficial atinge níveis de 27 mN/m em concentrações menores de 20 µM e reduz a tensão interfacial com hexadecano para 1 mN/m.

Estruturalmente a surfactina se apresenta como um heptapeptídeo unido por ligações lactônicas a um ácido graxo β-hidróxi, contendo de 13 a 15 átomos de carbono. Esta molécula simples se apresenta como um promissor agente antitumoral, antiviral, anti-micoplasma, imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas (PEYPOUX et al., 1999). Dentre os efeitos biológicos da surfactina, também se destaca a atividade antimicrobiana (BARROS et al., 2007), a inibição da coagulação de fibrina (RODRIGUES et al., 2006) e a lise de eritrócitos, de esferoplastos e de protoplastos de algumas bactérias (OHNO et al., 1995). A ação da surfactina parece estar relacionada a alterações na integridade das membranas celulares (NITSCHKE, 2004).

No entanto, a produção de biossurfactantes ainda apresenta dificuldades, visto que, a utilização dos componentes químicos representam elevados custos de produção. Neste sentido, a busca de meios de produção de baixo custo reduziria em torno de 10 a 30% os custos de produção (MAKKAR, CAMEOTRA, 2002; RUFINO, SARUBBO, CAMPOS-TAKAKI, 2007).

O objetivo deste trabalho foi o estudo da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* utilizando meios contendo substratos agroindustriais: (farinha da palha de arroz, batata inglesa e grãos de soja) como substratos de fontes renováveis. Os biossurfactantes produzidos foram avaliados pelo índice de emulsificação e tensão superficial, com posterior isolamento, purificação parcial e caracterização.

Materiais e Métodos

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado como produtor de biossurfactante foi a *Bacillus subtilis* UCP 0999, gentilmente cedida pela coleção de cultura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, a qual é registrada no World Federation Culture Collection-WFCC. A cultura foi mantida em Ágar Nutriente [(p/v) peptona 5g, extrato de carne 3g, cloreto de sódio 1g, ágar 15g, água destilada qsp. 1000mL], e mantido a temperatura de 5°C.

2.2 Substratos

Foram utilizados como substratos agroindustriais farinha da palha de arroz (*Oryza sativa*), batata inglesa (*Solanum tuberosum*) e grãos de soja (*Sorghum vulgare*), adquiridos indústrias de alimentos naturais e de qualidade alimentar.

Todos os reagentes e solventes usados nos experimentos foram de pureza analítica, obtidos da Reagem.

2.3 Métodos Microbiológicos

Detecção de Produção de Biossurfactante

O microrganismo foi inicialmente submetido ao teste hemolítico em Agar sangue, de acordo com a metodologia de Mulligan (2004). As placas foram incubadas por 48h a 30°C, com a finalidade de evidenciar a produção de biossurfactante com a formação do halo de hemólise.

Condições de Cultivo e Produção de Biossurfactante

O *Bacillus subtilis* foi repicado para placas de Petri contendo Ágar nutritivo (AN), incubados à temperatura de 30°C por 24 horas. Em seguida, a cultura foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 100mL de Caldo Nutriente, incubados “overnight”, sob agitação orbital de 150 rpm, à temperatura de 37° C, correspondendo, ao final, a 10⁶ UFC/mL, servindo de pré-inóculo. Em seguida, 5% do pré-inóculo foi transferido para frascos de Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL dos meios contendo: farinha da palha de arroz, batata inglesa e grãos de soja, com e sem adição de peptona, sulfato de amônia e micro nutrientes, como apresentado nas Tabelas 1 e 2. Os frascos foram incubados sob agitação orbital de 200 rpm, por 72 horas à temperatura de 30° C. O líquido metabólico livre de células foi obtido por centrifugação (10.000g) e sobrenadante filtrado (Millipore de 0.22 µm) sendo determinados: pH, índice de emulsificação e a tensão superficial e caracterização.

Preparação dos Meios com Substratos Agroindustriais

Os meios para produção foram feitos com: para cada litro de água foi usado 100g de farinha da palha de arroz, grão de soja e batatas inglesas. Em seguida os meios foram autoclavados em vapor fluente e filtrados.

2.4 Métodos Analíticos

Determinação da Biomassa

Após as 72 horas de cultivo, o líquido metabólico foi centrifugado a 10000g por 15 minutos para separação da biomassa. A biomassa foi lavada três vezes com água destilada e transferido para frascos previamente pesados. Em seguida, os frascos foram mantidos em estufa a 30°.C, até peso constante.

Determinação do pH

Foi utilizado o potenciômetro para a medição do pH das alíquotas coletadas dos meios de produção livre de células.

Índice de Emulsificação

O líquido metabólico livre de células foi utilizado para estimação do índice de emulsificação do biossurfactante segundo, COOPER e GOLDENBERG (1987). Foram

utilizados 2 mL de líquido metabólico e 1 mL do óleo de motor, querosene ou diesel. O material foi homogeneizado em vórtex por 2 minutos à 25° C. Após 24 h as leituras foram realizadas através da equação índice da emulsão (%) = $He \times 100 / Ht$, onde He = altura da emulsão; Ht = altura total do líquido. O resultado obtido foi expresso em percentual.

Tensão Superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada em tensiômetro automático (modelo Sigma 70 KSV Ltda., Finland) utilizando um anel de platina – iridium. As análises foram realizadas a 25° C e o aparelho foi previamente calibrado de acordo com Kuyukina (2001).

Isolamento, Purificação e Caracterização do Biossurfactante

O biossurfactante produzido foi extraído pela metodologia descrita por Haddad *et al.* (2008) nos meios em estudo, a partir do líquido metabólico livre de células obtidas por centrifugação a 10.000g. O sobrenadante foi filtrado utilizando membrana (filtro Milipore de 0,22µm), e o pH do filtrado foi ajustado para 2,0 com uma solução de 3M de HCl, em seguida, mantido “overnight” `temperatura de 5°C. Após este tempo, foi centrifugado a 10000g por 15 minutos para separação do precipitado.

A purificação do biossurfactante foi realizada dissolvendo o precipitado em água deionizada com pH 8.0 e extração ocorreu com o mesmo volume de diclorometano, por agitação de 5 minutos, seguido de repouso de 1 hora até ocorrer à separação de fases. Este procedimento foi repetido por três vezes. A fase orgânica foi coletada e evaporada em rota evaporador. O produto obtido foi dissolvido com água deionizada pH 8.0.

As amostras de soja foram analisadas através de espectros infravermelhos, registrados em espectrofotômetro Bio-Rad modelo FTR 165, ajustados em faixa de 400 a 3800 cm⁻¹.

3. Resultados

Os resultados obtidos indicaram que a linhagem de *Bacillus subtilis* UCP0999, quando cultivada na presença de ágar sangue apresenta a formação de um halo de hemólise, após o período de incubação por 48 horas, à temperatura de 30°C, sugerindo que a bactéria é produtora de biossurfactante (Figura 1).

A maior produção de biomassa foi observada nos meios contendo farinha de farelo de arroz com micro nutriente (8,60g/L), seguida de sulfato de amônia (6,10g/L) e peptona (4,00g/L). O meio de soja apresentou maior valor de biomassa com a adição de sulfato de amônia (4,60g/L), seguido da soja sem adição nenhuma (4,50g/L) e com peptona (3,7g/L). Com o meio de batata inglesa, as produções de biomassa apresentaram valores, discretamente, inferiores aos demais substratos, apresentando maior resposta com peptona (4,6g/L), seguido de sulfato de amônia (2,90g/L) e micro nutrientes (1,40g/L), respectivamente. O pH do meio contendo farelo de arroz passou de 5.8 para valores acima de 6.0 se mantendo constante até o final da fermentação; contudo, com os meios de batata inglesa e soja o pH da fermentação em manteve em faixa alcalina e todas as condições estudadas, peptona, micronutrientes e sulfato de amônia (Tabelas 3,4 e 5).

Altos índices de emulsificação foram observados com farinha da palha de arroz, apenas em óleo de motor. Porém, os melhores resultados foram apresentados nos meios de batata acrescidos de sulfato de amônia e micro nutrientes em óleo de motor e diesel. Os meios de soja foram observados índices, significativos, de emulsificação em todas as condições. Entretanto, as condições com sulfato de amônia e micronutrientes com óleo de motor e diesel apresentaram altos índices de emulsificação, semelhantes aos demais substratos utilizados (arroz e batata). Apenas com os meios de farinha da palha de arroz, nas condições estudadas com querosene, observaram-se baixos índices de emulsificação (Tabelas 3,4 e 5.; Figuras 3, 5 e 7).

As fontes de carbono utilizadas neste trabalho: farinha da palha de arroz, batata inglesa e soja na formulação de meios líquidos onde foi crescido o *B. subtilis* observou-se à produção de um biossurfactante em todos os meios, o qual reduziu a tensão superficial da água de 72 mN/m para 52,40, 51,70 e 45,90 mN/m, respectivamente. No entanto, com os meios de Soja e farinha da palha de arroz, a adição de peptona a tensão superficial da água foi reduzida de 72 mN/m para 37,70 e 37,80 mN/m, respectivamente. Contudo, a adição de micronutrientes ao meio de soja, apresentou a redução mais significativa de 72 mN/m para 35,60mN/m (Tabelas 3,4 e 5.; Figuras 3,5 e 7).

A maior produtividade de biossurfactante ocorreu no meio contendo soja adicionado de micronutrientes (3.357,00mg/L), seguido do meio de batata e micronutrientes (2.481,00mg/L) e farinha de farelo de arroz adicionado de peptona (300mg/L) (Tabelas 4,5.e 3; Figuras 3,5 e 7).

A figura ??? mostra o espectro de infravermelho do surfactante produzido por *Bacillus subtilis* UCP 0999 em meio contendo soja. Pode-se observar banda característica de peptídeos a 3382.75 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H. As bandas de absorção nas freqüências de 2960.70 a 2852.82 cm^{-1} são referentes a cadeias alifáticas (-CH₃, -CH₂). A Banda de 1742.68 cm^{-1} referente á absorção do grupo carbonila de anel lactona. Em 1618.12 cm^{-1} , observa-se o estiramento da ligação C=O e em 1500 cm^{-1} . Estes resultados indicam que a amostra analisada contém cadeia alifática bem como uma porção peptídica. O espectro infravermelho obtido da amostra analisada mostrou-se muito semelhante ao obtido com a surfactina padrão (SIGMA) por NITSCHKE (2004).

4. Discussão

Considerando a característica anfifílica dos biossurfactantes a literatura sugere que a indução ao processo de hemólise está relacionada à concentração de surfactina produzido pelo microrganismo (VINARDELL, INFANTE, 1999; NOUDEH *et al.* 2005). A hemólise em placas com ágar sangue vem sendo muito utilizada para seleção de microrganismos produtores de surfactantes (BANAT, 1993).

Carrilo *et al.* (1996) sugerem que pode existir uma relação entre o diâmetro do halo de hemólise e a concentração do biossurfactante produzido. No entanto, nem todo biossurfactante apresenta atividade hemolítica podendo outros compostos causar essa hemólise (YUSSEF *et al.* 2004). Mesmo assim, esse método é usado como um teste indicativo da produção de biossurfactante, por ser considerado simples e prático, na seleção de microrganismos produtores (YONEBAYASHI *et al.* 2000).

A capacidade de estabilizar emulsões é um parâmetro também utilizado para averiguar a atividade superficial de surfactantes. Além disso, substâncias que apresentam essa capacidade apresentam importância relevante na composição de produtos cosméticos, alimentícios e ainda como detergentes ou agentes de limpeza (COSTA, 2005). Portanto, os resultados com os altos índices de emulsificação do biossurfactante produzido por *B. subtilis* em meios a base substratos agroindustriais,

são significativos, comparados a trabalhos semelhantes na literatura (CUBITTO *et al.*, 2004; MOHAMMAD *et al.*, 2008).

A formulação de um meio de cultivo para a obtenção de biomassa ou metabólitos secundários sintetizados por um microrganismo demonstra que vários elementos que compõem e caracterizam o meio de cultivo são determinantes. Entre os elementos que demandam estudos com a formulação de um meio de cultivo estão: fonte de carbono (que apresenta uma grande variedade, incluindo hidrocarbonetos, carboidratos e óleos vegetais); fonte de nitrogênio e micro nutrientes (SANTOS, 2004). Neste sentido, os meios de soja e farinha da palha de arroz demonstraram resultados significativos, quanto à redução da tensão superficial, na produção de biossurfactante pela linhagem utilizada, em especial quando foi suplementado com micro nutrientes e peptona. Portanto, essa redução da tensão superficial no meio de farelo de arroz com peptona é descrita segundo Davis, *et al.* (1999), através do efeito da fonte de nitrogênio, como essencial para a biossíntese dos compostos tensoativos. Cooper e colaboradores (1981) observaram a importância da adição de ferro e manganês na produção de um biossurfactante por *Bacillus subtilis*, demonstrando, resultados semelhantes aos encontrados, neste trabalho, com meio de soja adicionado a tais micro nutrientes.

Por outro lado, Costa (2005) conseguiu um rendimento de 3,2 g/L de surfactante bruto utilizando a manípueira suplementada com peptona. Em trabalhos utilizando água de turfa com 0,01% de peptona, houve uma redução da tensão superficial para 27mN/m (MULLIGAN e COOPER, 1985). Pesquisas realizadas com o meio de farelo de arroz suplementado com solução contendo traços de elementos, não apresentou redução significativa da tensão superficial, mesmo tendo entre esses micro nutrientes os elementos FeSO₄ e MnSO₄, considerados elementos indutores da produção de surfactina (WEI *et al.* 2004). Por outro lado, esses elementos foram significativos na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UCP 0999 em meio de soja.

Observou-se que a adição de micro nutrientes aos meios de farinha da palha de arroz e soja induziram a uma maior produtividade do biossurfactante, cujos resultados são apoiados por Fox e Bala (2000), que relata a importância da presença de carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e minerais inorgânicos na produção do biossurfactante surfactina.

A literatura mostra que linhagens de *Bacillus subtilis* quando cultivados em meio de batata ou subprodutos da soja, induz a produz de surfactina (OHNO *et al.* 1995; FOX, BALA, 2000). No entanto, não há relatos na literatura quanto a produção de biossurfactante por microrganismos utilizando farinha da palha de arroz.

A presença do anel lactona, no surfactante produzido com meio contendo soja, foi indicado pelo espectro infravermelho, o qual foi confirmado a presença de cadeias alifáticas.

Os estudos realizados indicaram que *B. subtilis* UCP 0999 que as fontes tradicionais podem ser substituídas pelos substratos agroindustriais utilizados nesta investigação, considerando o baixo custo na produção. Adicionalmente, o biossurfactante isolado demonstrou potencial para uso em processos de remoção de derivados do petróleo, considerando a alta atividade de emulsificação e a possibilidade de utilização como extrato bruto. Contudo, estudos de otimização devem ser efetuados para permitir maior produtividade do biossurfactante.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio dos órgãos de fomento á pesquisa CNPq, FACEPE, CAPES e PROCAD-CAPES.

5. Referencias

COSTA, Giselle Aparecida Nobre, 2005. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. Dissertação de mestrado Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

BANAT, I.M., 1993. The isolation of a thermophilic biosurfactant-producing *Bacillus subtilis* species. *Biotechnol. Lett.* 15, 591-594.

BARROS, F. F. C. et al. 2007. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quím. Nova.* 30, 409-414.

BOGNOLO, G., 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engin. Aspect.*, 152, 41-52.

CARRILLO, et al. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*12, 82-84.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S., 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Cur. Opin. Microbiol.*, 7, 262–266.

COOPER, D.G. *et al.* Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.408-412, 1981.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G., 1987. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 224 –229.

CUBITTO, M.A. et al. (2004). Effects of *Bacillus subtilis* 09 biosurfactant on the biorremediation of crud oil-polluted soils. *Biodegradation*, 15, 281-287.

DESAI, J. D.; BANAT, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 61,47-64.

DAVIS, D.A. et al (1999). The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 25, 322-329.

DOUBEH, G.D. *et al.*(2005). Isolation, characterization, and Investigation of Surface and Hemolytic Activities of a Lipopeptide Biosurfactant Produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *J. Microbiol.* 43, 272-276.

FOX, S.L., BALA, G.A. 200. Production of surfactant *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Biores. Technol.* 75, 235-240.

HADDAD, N.I.A. *et al.* (2008). Surfactin isoforms from *Bacillus subtilis* HSO121: separation and characterization. *Protein Pept Lett*, 15, 265-269.

KUYUKINA, M.S. *et al.* (2001) Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J. Microbiol. Meth.*, 46, 109-120.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S., 2002. An update on use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 428-434.

MOHAMMAD, A.M. *et al.* (2008). Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150, 289-303.

MULLIGAN, C.N.; COOPER, D.G., 1985. Pressate from peat dewatering as a substrate for bacterial growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 160-162.

MULLIGAN, C.N., 2004. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*, 133, 183-198.

NITSCHKE, M. 2004. Produção e Caracterização de Biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando Manipueira como Substrato. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

OHNO, A. *et al.*(1995). Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin with recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 209-214.

PEYPOUX, F.*et al.* (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 553-563.

RODRIGUES, L. *et al.* (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 57, 609-618.

RUFINO, R.D., SARUBBO, L.A, CAMPOS-TAKAKI, G.M. 2007. Enhancement of stability of biosurfactant produced by candida lipolytica using industrial residue as substrate. World J Microbiol Biotechnol 23,734-741.

SANTOS, A. S. 2004. Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

VINARDELL, M.P.; INFANTE, M.R. 1999. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. Comp. Biochem. Phys. C124, 117-120.

WEI, Y. H. et al (2004). Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Progress, 20, 976-683.

YUSSEF et al.(2004). Comparasion of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J. Microbiol. Method., 56, 339-347.

YONEBAYASHI, H. et al. (2000) Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery process. Seky. Gakk. 43, 59-69.

CAPÍTULO 3

Conclusões Gerais

- O estudo realizado com *Bacillus subtilis* UCP 0999 apresenta as seguintes conclusões:
- O biossurfactante produzido no meio de farinha da palha de arroz e soja com adição de peptona reduz a tensão superficial e apresenta habilidade de emulsificar óleo de motor;
- O Meio de soja com micro nutrientes reduz a tensão superficial e apresenta alta capacidade emulsificante em óleo de motor.
- Nos meios de batata suplementados com micronutrientes e sulfato de amônia o biossurfactante produzido apresenta altos níveis de emulsificação com óleo de motor e diesel;
- O uso de substratos agroindustriais (farinha da palha de arroz, batata e soja) podem substituir as fontes tradicionais de produção de biossurfactantes, considerando de baixo custo;
- O biossurfactante produzido demonstrou potencial para uso em processos de remoção de derivados de petróleo.

ANEXOS

Tabela 1. Componentes dos meios de produção.

Suplementos	Batata	Soja	Farelo de Arroz
Controle (g/L)	100,0	100,0	100,0
Peptona (g/L)	2,0	2,0	2,0
Solução de Micro nutrientes v/v	0,1	0,1	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	2,0	2,0	2,0

Tabela 2. Composição da solução de micro nutrientes.

Componentes	Concentrações (g/L)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10,95
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5,00
MnSO ₄ . H ₂ O	1,54
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,39
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,25
NaB ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,17
EDTA	2,50

Fonte: Morán *et al.*, 2000.

Tabela 3. Produção de biomassa (mg/L), pH, índice de emulsificação (%), tensão superficial e rendimento do biossurfactante (mg/L) produzido por *Bacillus subtilis* Em meio de farelo de arroz.

Parâmetros	Farinha palha Arroz	de Farinha de palha de Arroz		
		Peptona (2g/L)	Sulfato amônia (2g/L)	de Micronutrientes (0,1%)
Biomassa (g/L)	2,0	4,0	6,1	8,6
pH	6,67	6,95	6,66	6,78
Índice de Emulsificação (%):				
Óleo de Motor	80,30	93,70	72,80	80,00
Diesel	27,10	-	-	36,00
Querosene	25,00	22,00	25,00	42,80
Tensão Superficial(mN/m)	52,40	37,80	50,00	47,80
Biossurfactante(mg/L)	296,00	300,00	181,00	227,72

Tabela 4. Produção de biomassa (mg/L), pH, índice de emulsificação (%), tensão superficial e rendimento do biossurfactante (mg/L) produzi por *Bacillus subtilis* em meio de batata inglesa.

Parâmetros	Batata inglesa	Batata inglesa Peptona(2g/L)	Batata inglesa Sulfato amônia (2g/L)	Batata inglesa de Micronutrientes (0,1%)
Biomassa (g/L)	2,20	4,60	2,90	1,40
pH	8,76	8,83	8,86	8,87
Índice de Emulsificação (%)				
Óleo de Motor	62,70	60,70	100,00	100,00
Diesel	62,70	60,70	100,00	100,00
Querosene	47,00	52,70	32,30	47,00
Tensão Superficial (mN/m)	51,70	49,70	52,50	48,20
Biossurfactante (mg/L)	290,00	179,00	164,00	2.481,00

Tabela 5. Produção de biomassa (mg/L), pH, índice de emulsificação (%), tensão superficial e rendimento do biossurfactante (mg/L) produzido por *Bacillus subtilis* em meio de soja

Parâmetros	Soja	Soja Peptona(2g/L)	Soja Sulfato amônia (2g/L)	Soja de Micronutrientes (0,1%)
Biomassa (g/L)	4,5	3,7	4,6	2,9
pH	8,80	8,88	8,82	8,88
Índice de Emulsificação (%)				
Óleo de Motor	60,70	65,10	81,30	100,00
Diesel	47,40	45,00	42,00	47,60
Querosene	62,50	50,00	35,70	66,60
Tensão Superficial (mN/m)	45,9	37,70	44,60	35,6
Biossurfactante (mg/L)	215,00	213,00	416,00	3.357,00



Figura 1. Halo de hemólise produzido por *Bacillus subtilis* UCP0999 em ágar sangue.

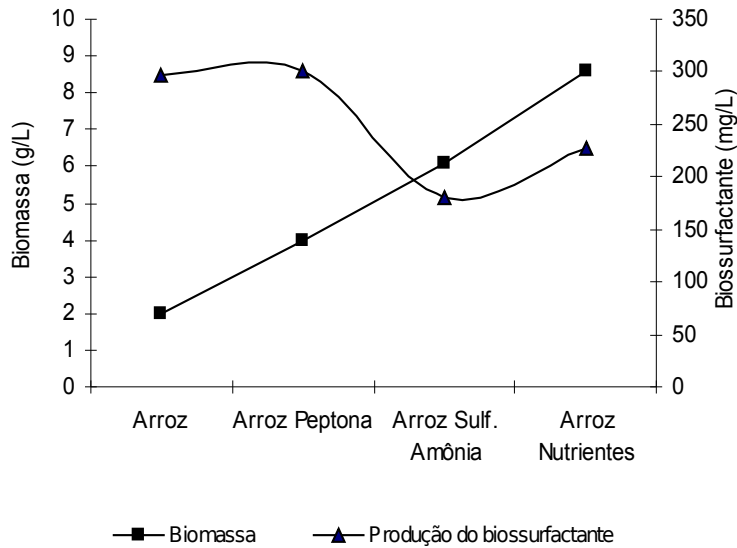


Figura 2: Gráfico da produção de biomassa (g/L) e biossurfactante (mg/L) por *Bacillus subtilis* UCP0999 no meio contendo farelo de arroz sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia.

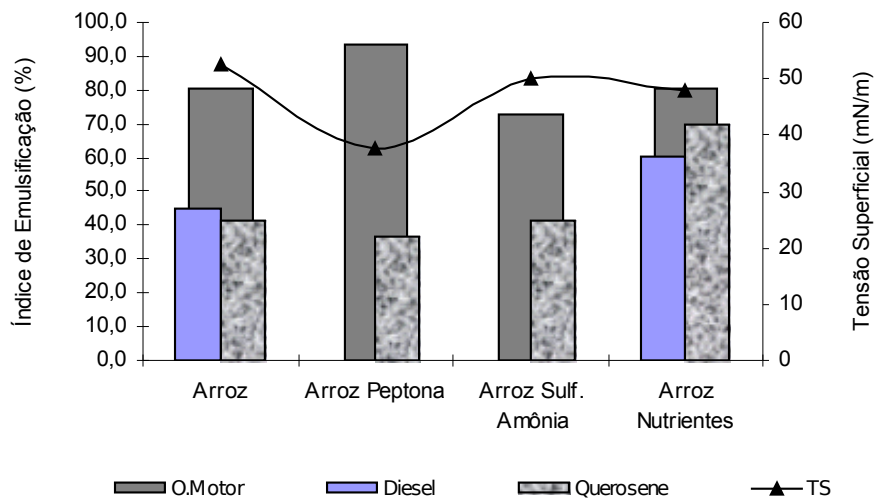


Figura 3: Gráfico do índice de emulsificação (%) e tensão superficial (mN/m) com o líquido metabólico após 72 horas de fermentação por *Bacillus subtilis* UCP999 no meio contendo farelo de arroz sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia em óleo de motor, diesel e querosene.

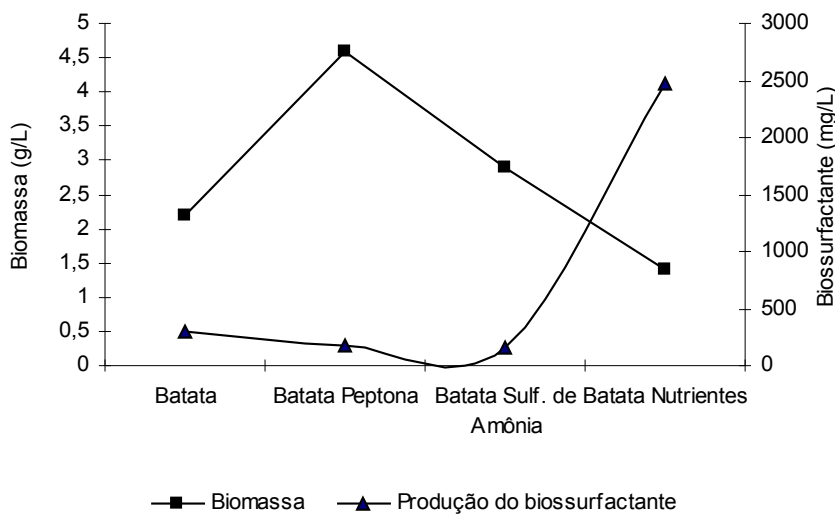


Figura 4: Gráfico da produção de biomassa (g/L) e biossurfactante (mg/L) por *Bacillus subtilis* UCP999 no meio contendo batata inglesa sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia.

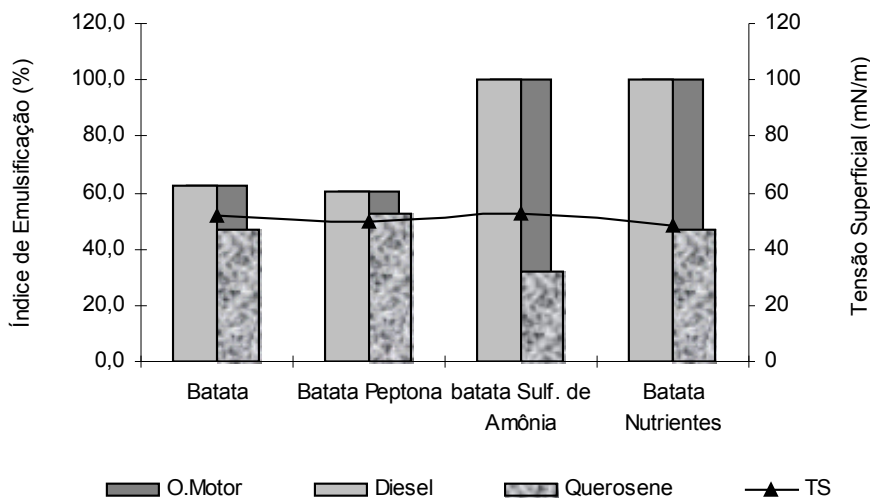


Figura 5: Gráfico do índice de emulsificação (%) e tensão superficial (mN/m) com o líquido metabólico após 72 horas de fermentação por *Bacillus subtilis* UCP999 no meio contendo batata inglesa sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia em óleo de motor, diesel e querosene.

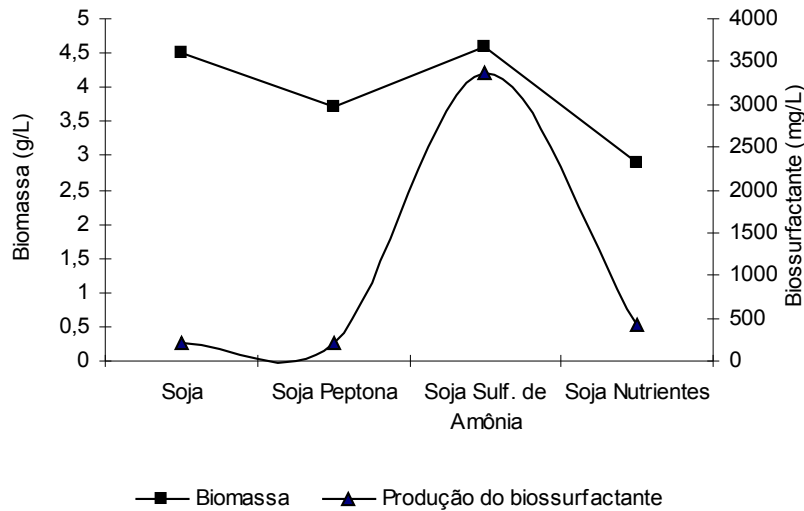


Figura 6: Gráfico da produção de biomassa (g/L) e biossurfactante (mg/L) por *Bacillus subtilis* UCP0999 no meio contendo soja sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia.

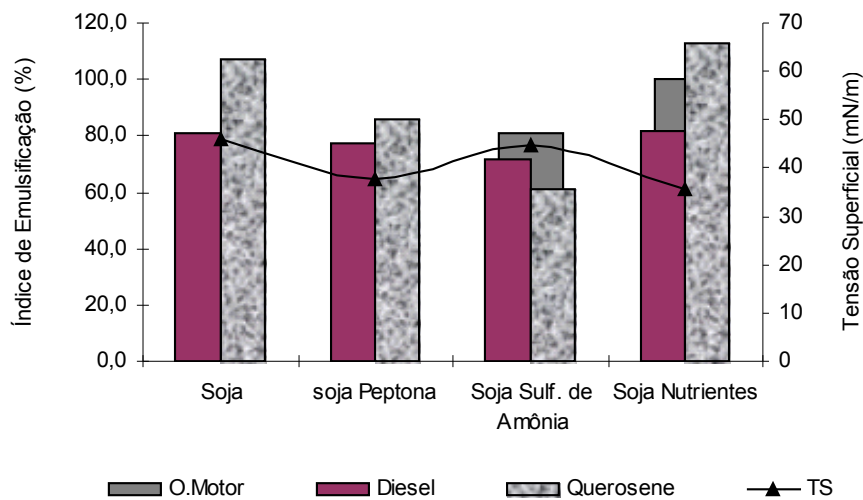


Figura 7: Gráfico do índice de emulsificação (%) e tensão superficial (mN/m) com o líquido metabólico após 72 horas de fermentação por *Bacillus subtilis* UCP 0999 no meio contendo farelo de arroz sem e com a adição de peptona, micronutrientes e sulfato de amônia em óleo de motor, diesel e querosene.

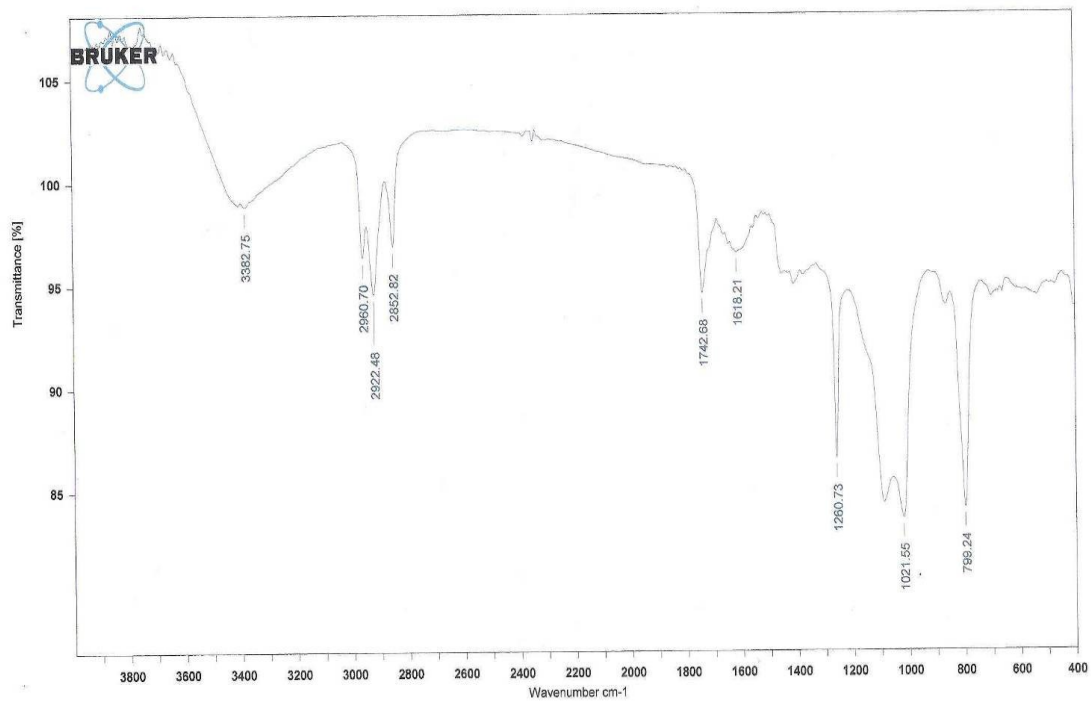


Figura 8: Espectro infravermelho da amostra de surfactante produzida por *Bacillus subtilis* UCP 0999 em meio contendo Soja.