

**Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e  
Bioquímicos**

**Dissertação de Mestrado**

**Otimização da Produção de Biossurfactante  
por Isolado *Bacillus subtilis* a partir de  
Matéria-Prima Renovável e de Baixo Custo**

**Rayane Rodrigues Fonseca Valpuesta**

Orientadores:

Prof<sup>ª</sup> Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

Março 2008

**Otimização da Produção de Biossurfactante por Isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-Prima Renovável e de Baixo Custo**

***Rayane Rodrigues Fonseca Valpuesta***

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado por:

---

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.  
(orientadora)

---

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.  
(orientador)

---

Denize Dias de Carvalho, D.Sc.

---

Antonio Carlos Augusto da Costa, D. Sc.

---

Antonio Jorge Ribeiro da Silva, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Março de 2008

## FICHA CATALOGRÁFICA

Valpuesta, Rayane Rodrigues Fonseca

Otimização da Produção de Biossurfactante por Isolado *Bacillus subtilis* a Partir Matéria-prima Renovável e de Baixo Custo / Rayane Rodrigues Fonseca Valpuesta. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2008.

xii, 104p.; il.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2008.

Orientador(es): Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Fernando Jorge S. de Oliveira.

1. Biossurfactante/Produção. 2. *Bacillus subtilis*. 3. lipopeptídeo.  
4. Otimização 5. Açúcar cristal

I. Título.

*Dedico ao Vitor por seu amor e companheirismo,  
aos meus pais pela confiança depositada ao longo de toda a vida  
e à família pelo total incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter dado força e perseverança para chegar até aqui e por toda as oportunidades que a vida nos dá.

Ao Vitor por seu amor incondicional, por sua força, pelo seu incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos pais, Rogério e Vânia, pelo exemplo de vida e caráter.

Aos meus familiares, em especial aos tios Guilherme e Rosilene por terem me adotado como filha durante esses anos de faculdade e mestrado.

À Prof<sup>a</sup> Eliana Flávia Camporese Sérvulo, pela a oportunidade dada para a realização deste trabalho, por ter-me apoiado, auxiliado e estimulado a crescer profissionalmente, minha total gratidão.

Ao Dr. Fernando Jorge Santos de Oliveira pelo auxílio, preocupação e disposição para a concretização deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Antônio Jorge Ribeiro pelo o apoio estrutural, sua atenção e por ter disponibilizado seu laboratório para a realização do seu trabalho.

Ao Laboratório de Superfície de Microorganismo, principalmente, às Dr<sup>as</sup> Celuta e Daniela que contribuíram significativamente com este trabalho.

Ao Douglas por sua preciosa ajuda e organização.

Aos funcionários da UFRJ, Paulinho, Gisele e Roselee pela ajuda prestada.

Às amigas Mariana e Renata pela inestimável amizade, compreensão e afeto.

Às amigas Cristiane, Karen, Natália, Adriana, Débora e Renata pelos momentos divertidos que passamos.

Aos companheiros de laboratório: Jú, Douglas, Kally, Ulrich (“infiltrado”), Tiago e João pelos momentos agradáveis.

À CAPES que apoiou esse trabalho..

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

## **Otimização da Produção de Biossurfactante por Isolado *Bacillus subtilis* a partir de Matéria-Prima Renovável e de Baixo Custo**

Rayane Rodrigues Fonseca Valpuesta

Março, 2008

Orientadores: Prof<sup>a</sup> Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

A linhagem *Bacillus subtilis* foi isolada de sistema *Landfarming* e testada, preliminarmente, para a produção de biossurfactante a partir de açúcar cristal (sacarose), utilizando solução de microssais (MS) e/ou extrato de lêvedo (EL). O melhor valor de tensão superficial foi 31,2 mN/m para açúcar cristal acrescido de MS. A influência de diferentes fontes de nitrogênio (uréia, levedura residual de cervejaria, sulfato de amônio, nitrato de sódio e nitrato de amônio) foi estudada na produção do composto tensoativo, utilizando-se, como fonte de carbono, o açúcar cristal acrescido de microssais. O maior valor de porcentagem de redução da tensão superficial foi obtido com 48 h de fermentação utilizando o nitrato de amônio. A otimização da relação carbono/nitrogênio (C/N) e da agitação foram observadas a partir de planejamento experimental fatorial completo e análise de superfície de respostas. A condição que mais favoreceu a produção do composto tensoativo foi a relação C/N 3 e a agitação 250rpm. Na condição ótima de produção foi feita uma cinética da síntese do biossurfactante, onde o menor valor de tensão superficial foi obtido com 19 h de processo. O biossurfactante produzido se manteve estável em diferentes valores de pH e temperatura. Preliminarmente, a caracterização do biossurfactante sugere tratar-se de um lipopeptídeo com alguns isômeros diferentes da surfactina comercial.

Abstract of a Thesis presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ-UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

## **Biosurfactant Production Optimization by an Isolated *Bacillus subtilis* Strain Using Renewable Raw Material and low cost**

Rayane Rodrigues Fonseca Valpuesta

Março, 2008

Supervisors: Prof. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Fernando Jorge Santos de Oliveira, D.Sc.

The *Bacillus subtilis* strain was isolated from a Landfarming system and tested, initially, for biosurfactant production in crystal sugar (sucrose), using micro-salts (MS) and/or yeast extract (EL). The lowest surface tension value found was 31.2 mN/m for MS-added crystal sugar. The influence of the various nitrogen sources (urea, brewery yeast, ammonium sulfate, sodium nitrate and ammonium nitrate) was studied for the tensoactive compound production employing, as the carbon source, micro-salt-added crystal sugar. The highest percentage of superficial tension reduction was reached at 48 h of fermentation using ammonium nitrate. The carbon/nitrogen (C/N) ratio optimization and agitation were investigated through a complete factorial experimental design and response surface analysis. The most favorable condition for biosurfactant production was found when a C/N ratio of 3 was applied, as well as agitation of 250 rpm. In the optimal production condition, a kinetic of the bioproduct synthesis was performed, when the lowest surface tension value was reached after 19 h of process. The produced biosurfactant remained stable in different levels of pH and temperature. Preliminarily, the biosurfactant characterization suggests that it is composed of a lipopeptide, some different isomers from commercial surfactin.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	13
1.2 OBJETIVOS .....	16
<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
2.1 SURFACTANTES .....	17
2.1.1 <i>Propriedades dos Surfactantes</i> .....	18
2.2 BIOSSURFACTANTES .....	22
2.2.1 <i>Tipos de Biossurfactantes</i> .....	23
2.2.2 <i>Função Fisiológica dos Biossurfactantes</i> .....	28
2.2.3 <i>Características dos Biossurfactantes</i> .....	29
2.3 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	31
2.3.2. <i>Lipopeptídios produzidos por Bacillus subtilis</i> .....	32
2.3.3. <i>Biossíntese da surfactina</i> .....	34
2.4 PARÂMETROS QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DA SURFACTINA .....	36
2.4.1. <i>Fonte de Carbono</i> .....	38
2.4.2 <i>Fonte de nitrogênio</i> .....	42
2.4.3 <i>Sais minerais</i> .....	42
2.4.4 <i>Condições ambientais</i> .....	43
2.5 RECUPERAÇÃO DA SURFACTINA .....	44
2.6 APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES .....	46
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
3.1 MICRORGANISMO .....	50
3.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA .....	50
3.3 MEIOS DE CULTURA .....	50
3.3.1 <i>Meio de inóculo</i> .....	50
3.3.2 <i>Meio de produção</i> .....	51
3.4 PREPARO DO INÓCULO .....	51
3.5 PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE .....	52
3.5.1 <i>Ensaio preliminares</i> .....	53
3.5.2 <i>Efeito da relação carbono/nitrogênio 3 agitação na produção de biossurfactante</i> .....	54
3.5.3 <i>Variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (<math>k_La</math>) para as diferentes velocidades de agitação</i> .....	56
3.5.4 <i>Cinética da produção de biossurfactante</i> .....	57
3.5.5 <i>Caracterização parcial do biossurfactante produzido</i> .....	58
3.5.6 <i>Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido</i> .....	58
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	58
3.6.1 <i>Tensão superficial</i> .....	58
3.6.2 <i>Determinação da diluição micelar crítica (DMC)</i> .....	59
3.6.3 <i>Índice de emulsificação</i> .....	59
3.6.4 <i>pH</i> .....	59
3.6.5 <i>Análise cromatográfica</i> .....	59
3.6.6 <i>Concentração do substrato</i> .....	60
3.6.7 <i>Peso seco</i> .....	60
3.6.8 <i>Concentração de células viáveis totais e esporos</i> .....	61
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
4.1 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SUPLEMENTOS AO MEIO DE PRODUÇÃO .....	62
4.2 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO .....	65
4.3 EFEITO DA RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE .....	68
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	76
4.4.1 <i>Planejamento experimental duas variáveis e três fatores</i> .....	76
4.4.2 <i>Planejamento experimental duas variáveis e dois fatores</i> .....	80



<b>4.5 VARIAÇÃO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO (<math>K_LA</math>) PARA AS DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITAÇÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>4.6 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE.....</b>	<b>86</b>
<b>4.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO .....</b>	<b>89</b>
<b>4.8 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO .....</b>	<b>92</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>CAPÍTULO 6: SUGESTÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>96</b>

## Sumário de Figuras

<b>Figura 2.1.</b> Representação esquemática da estrutura de um surfactante.....	17
<b>Figura 2.2.</b> Representação da adsorção ou absorção de moléculas de surfactante em diferentes sistemas.....	19
<b>Figura 2.3.</b> Efeito da concentração de um surfactante na adsorção em superfície hidrofóbicas.....	20
<b>Figura 2.4.</b> Variação da tensão superficial em função da concentração de surfactante indicando o ponto correspondente à concentração micelar crítica (CMC). .....	21
<b>Figura 2.5.</b> Ramnolipídio produzido por <i>Pseudomonas</i> sp.....	25
<b>Figura 2.6.</b> Estrutura do soforoselipídio produzido por <i>Candida bombicola</i> .....	25
<b>Figura 2.7.</b> Estrutura de trealoselipídio produzido por <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	26
<b>Figura 2.8.</b> Estrutura de um fosfatidiletanolamina, um potente biosurfactante produzido por <i>Acinetobacter</i> sp. ( $R_1$ e $R_2$ são cadeias de ácidos graxos).....	26
<b>Figura 2.9.</b> Estrutura de um lipopeptídeo (surfactina) produzido por <i>Bacillus subtilis</i> . 27	
<b>Figura 2.10.</b> Estrutura geral do emulsan produzido por <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1.....	27
<b>Figura 2.11.</b> Representação molecular dos lipopeptídios: (a) Surfactina e (b) Iturina A.....	33
<b>Figura 2.12.</b> Esquema da síntese da surfactina.....	35
<b>Figura 4.1.</b> Variação da tensão superficial dos meios de produção após 48 hs de cultivo da linhagem isolada de <i>B. subtilis</i> (AC - Açúcar cristal; El – extrato de lêvedo; Ms – micronutrientes).....	62
<b>Figura 4.2.</b> Resultados obtidos para a condição C/N = 3 em função da agitação.....	71
<b>Figura 4.3.</b> Resultados obtidos para a condição C/N = 9 em função da agitação.....	72
<b>Figura 4.4.</b> Valores obtidos para C/N=15 sob diferentes velocidades de agitação.....	73
<b>Figura 4.5.</b> Distribuição dos resíduos relativa ao percentual da redução da tensão superficial.....	76
<b>Figura 4.6.</b> Valores preditos em função dos observados relativos ao percentual da redução da tensão superficial.....	78
<b>Figura 4.7.</b> Superfície de resposta para o percentual de redução da tensão superficial em função da relação C/N e do nível de agitação.....	80

<b>Figura 4.8.</b> Diagrama de Pareto em função estatística do teste t.....	82
<b>Figura 4.9.</b> Distribuição dos resíduos relativa ao percentual da redução da tensão superficial.....	83
<b>Figura 4.10.</b> Valores preditos em função dos observados relativos ao percentual da redução da tensão superficial.....	83
<b>Figura 4.11.</b> Superfície de resposta para o percentual de redução da tensão superficial.....	84
<b>Figura 4.12.</b> Cinética da produção de biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> YRE 207.....	87
<b>Figura 4.13.</b> Perfil cromatográfico a) da surfactina fornecida pela Sigma e b) da amostra C/N=3 e 250 rpm após a ultrafiltração em membrana de 10 kDa.....	98

## Sumário de Tabelas e Quadros

<b>Quadro 2.1.</b> Métodos de recuperação de biossurfactante, respectivas propriedades físico-químicas e vantagens.....	45
<b>Tabela 2.1</b> Exemplos de surfactantes comerciais.....	18
<b>Tabela 2.2.</b> Surfactantes sintéticos e respectivos valores de tensão superficial.....	21
<b>Tabela 2.3.</b> Principais tipos de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores.....	24
<b>Tabela 2.4.</b> Classificação dos principais biossurfactantes e respectivas massas moleculares.....	31
<b>Tabela 2.5.</b> Comparação do custo comercial dos surfactantes químicos e biossurfactantes.....	37
<b>Tabela 2.6.</b> Parâmetros determinados na produção de biossurfactantes por diferentes linhagens de <i>Bacillus subtilis</i> .....	40
<b>Tabela 2.7.</b> Possíveis aplicações em diversos setores industriais.....	46
<b>Tabela 3.1</b> Composição da solução de micronutrientes.....	51
<b>Tabela 3.2</b> Matriz do Planejamento.....	55
<b>Tabela 3.3</b> Matriz do Planejamento .....	56
<b>Tabela 4.1.</b> Valores de pH nos diferentes meios após cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> YRE 207.....	64
<b>Tabela 4.2.</b> Influência da fonte de nitrogênio na tensão superficial e pH em cultivos de linhagem isolada de <i>Bacillus subtilis</i> .....	65
<b>Tabela 4.3.</b> Valores médios de tensão superficial determinados nos meios fermentados em diferentes condições experimentais.....	69
<b>Tabela 4.4.</b> em diferentes condições experimentais.....	75
<b>Tabela 4.5</b> Resultados da regressão múltipla para redução da tensão superficial .....	76
<b>Tabela 4.6</b> Dados da porcentagem da redução da tensão superficial.....	81
<b>Tabela 4.7.</b> Valores de $k_{La}$ em função da agitação.....	86
<b>Tabela. 4.8</b> Estabilidade do biossurfactante produzido pela <i>B.subtilis</i> em diferentes pH e temperaturas .....	93

## Lista de abreviaturas

- $E_{24}$  índice de emulsificação para determinação em 24 horas (%)
- rpm rotações por minuto
- T temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
- $X_0$  concentração celular inicial (g/L)
- $T_s$  tensão superficial (mN/m)
- CMC concentração micelar crítica
- DMC Diluição micelar crítica
- C/N Relação carbono nitrogênio
- AG Agitação

# CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações iniciais

O termo surfactante é oriundo da abreviatura da expressão em inglês SURFace ACTive AgeNTS (CRISTOFI e ISHIVA, 2002). Na língua portuguesa, também são usadas as expressões composto tensoativo ou agente tensoativo. Por definição, os surfactantes são moléculas anfífilas, ou seja, apresentam grupos hidrofílico e hidrofóbico na mesma molécula, o que lhes confere a propriedade de interagir na interface entre fluidos de diferentes polaridades como, por exemplo, água e óleo. O emprego destes compostos promove a redução das tensões interfacial e superficial, e também pode aumentar a solubilidade e mobilidade de compostos hidrofóbicos ou orgânicos insolúveis em soluções aquosas (SINGH, VAN HAMME e WARD, 2007).

Devido a suas propriedades, os surfactantes apresentam um vasto campo de aplicação, nos mais diversos setores industriais (MULLIGAN e GIBBS, 1993). Em particular no setor petrolífero, destaca-se o seu emprego na recuperação de óleo de reservatórios, limpeza de tanque de estocagem, transporte de óleo em oleodutos, como auxiliar no tratamento despoluente de ambientes acometidos por derrames de petróleo, remoção de betume de areias oleosas, entre outros (MORKES, 1993; BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000; KIM *et al.*, 2000; SHCRAM, 2000). Por exemplo, o emprego de surfactante é uma alternativa na recuperação de petróleo, já que a recuperação primária\* permite recuperar apenas 10 a 30% do volume total do óleo contido no reservatório (ROSA, 2007). É também comum o emprego de surfactantes nos setores alimentício, farmacêutico e têxtil, em formulações de cremes dentais e cosméticos, na agricultura e na medicina (DELEU *et al.*, 1999; KARANTH, DEO e VEENANADIG, 1999; RON e ROSEMBERG, 2002).

Em geral, os surfactantes comerciais são sintetizados à partir de derivados do petróleo, embora possam ser obtidos por via microbiana, e até mesmo à partir da extração vegetal (saponinas), estando inclusive presentes no organismo humano (BOGNOLO, 1999). Os tensoativos naturais incluem: lipídeos simples (ésteres de ácido carboxílico), lipídeos complexos (ésteres de ácidos graxos contendo fósforo, base nitrogenadas, e/ou açúcares) e ácidos bilícos (ácido cólico e deoxicólico) (MANIASSO,

\*Recuperação primária – extração de óleo de reservatório utilizando apenas a sua energia natural, ou seja, a pressão nele existente (PETROBRAS, 2003; THOMAS, 2004; ROSA, 2007).

2001). Em 2004, o total de surfactantes químicos e biológicos mundialmente produzidos foi equivalente a 48 bilhões de dólares, dos quais cerca de 40% correspondendo à produção norte-americana (CAMEOTRA e MAKKAR, 2004). Deste montante, os de origem microbiana representam ainda uma parte muito pequena.

Os compostos de origem sintética são eficientes e baratos, porém não são biodegradáveis (BANAT, 1995). Ademais, ainda são desconhecidos os efeitos que podem advir do seu acúmulo nos seres vivos e no ambiente (BARROS *et al.*, 2007). Por isso, a ingestão ou absorção dos surfactantes pelo consumo de alimentos e fármacos, bem como pelo uso de cosméticos e produtos de higiene, mesmo que em doses reduzidas, poderá ser a causa de danos aos seres humanos *a posteriori* (SISINNO, 2002). Esta possibilidade, reforçada pela preferência do consumidor pelos produtos que apresentam em sua formulação compostos de origem natural ao invés dos sintéticos, tem estimulado a substituição dos surfactantes de origem petroquímica por novos produtos biodegradáveis. Esta tendência tem sido ainda mais estimulada pela crescente cotação do petróleo, que já alcançou cifra superior à US\$ 100,00/barril (O GLOBO, 29 de fevereiro de 2008), aliada ao inevitável esgotamento deste recurso não renovável.

Dada a possibilidade de obtenção de compostos tensoativos por via microbiana, bem como de serem várias as espécies microbianas capazes de sintetizá-los a partir de diferentes fontes renováveis, inúmeros estudos vêm sendo realizados com o propósito de desenvolver produtos com propriedades tensoativas biodegradáveis, ou seja, inócuos aos seres vivos. Os surfactantes de origem microbiana, ditos biossurfactantes, formam um grupo heterogêneo de moléculas, visto que podem apresentar distintas estruturas químicas. O tipo e a quantidade de biossurfactante dependem do microrganismo produtor, da composição do meio de produção e das condições operacionais. Por isto, os biossurfactantes podem apresentar, além das propriedades químicas similares aos sintéticos, vantagens tais como especificidade, termoestabilidade, e tolerância à força iônica (MULLIGAN *et al.*, 1989).

A produção de compostos tensoativos por microrganismos é conhecida há muitos anos (ARIMA *et al.*, 1968). Alguns destes compostos, como emulsan e alasan, já estão sendo inclusive comercializados para fins industriais. Outros, como os lipopeptídeos, estão sendo muito estudados em virtude do seu elevado potencial para reduzir as tensões superficial e interfacial de fluidos, o que lhes confere propriedades de importância para diversas aplicações industriais (MULLIGAN, 2005).

Um grande desafio da produção de biossurfactantes é o desenvolvimento de tecnologias que permitam reduzir os custos de produção a fim de torná-los competitivos com os de origem química. Uma alternativa é o desenvolvimento de meios de cultura através do emprego de matérias-primas renováveis, de baixo custo e facilmente disponíveis. De acordo com Cameotra e Makkar (1998), o custo da matéria-prima não deve ultrapassar de 10 a 30% do custo do produto final.

O Brasil é uma fonte inestimável de recursos naturais renováveis que possibilitam a formulação de meios de cultivo a um baixo custo. Por exemplo, a cana-de-açúcar, um dos principais produtos agrícolas do Brasil, é cultivada em várias regiões do território nacional. Por conta dos menores custos de produção, em consequência do uso de tecnologia e gestão de vanguarda, o nosso país é considerado o maior produtor e exportador de açúcar de cana do mundo. Em 2000, metade da produção brasileira foi exportada, gerando 1,2 bilhões de dólares em divisas para a balança comercial do país (SEVERO, 2004)

O açúcar cristal, uma matéria-prima de baixo custo, fácil disponibilidade e aquisição, já vem sendo utilizado por diferentes indústrias brasileiras para a produção microbiana de bens de alto valor agregado, como por exemplo, ácido láctico e ácido cítrico. Outra possibilidade é empregar matérias-primas não convencionais, como os rejeitos industriais, uma vez que existem espécies microbianas com capacidade de metabolizar as mais variadas fontes de carbono. Um dos entraves para uso dos rejeitos está na posterior recuperação do produto; a pequena quantidade do bioproduto e o alto conteúdo de impurezas no mosto fermentado dificultam e oneram os tratamentos de separação e purificação, quando necessários.

Neste contexto, existe um vasto campo de estudos para o desenvolvimento de tecnologias para a produção nacional de biossurfactantes, que permitam alcançar elevados rendimentos e produtividades do processo, e produtos de baixo custo. Por exemplo, é de interesse avaliar a potencialidade de diferentes linhagens microbianas e definir formulações de meios usando matérias-primas disponíveis em abundância.



## 1.2 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral a otimização de alguns parâmetros do processo de produção de biossurfactante pela linhagem de *Bacillus subtilis* YRE207, isolada de *Landfarming*, a partir de açúcar cristal, fonte de carbono comercialmente disponível e de baixo custo. A produção de biossurfactante pela linhagem isolada foi estudada uma vez que ensaios preliminares demonstraram ser esta promissora em comparação com outras linhagens já testadas.

Com este propósito, foi dada ênfase aos seguintes objetivos específicos:

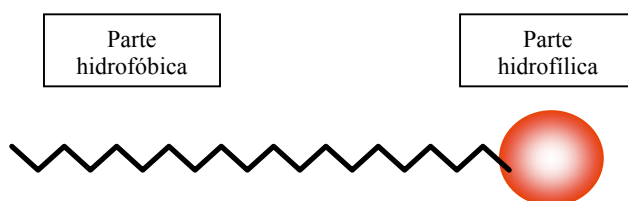
- Avaliar a influência da suplementação do meio com micronutrientes e/ou extrato de levedo na produção do biossurfactante, considerando a redução percentual da tensão superficial;
- Determinar a influência de diferentes fontes de nitrogênio – nitrato de sódio, nitrato de amônio, sulfato de amônio, uréia e levedura residual de cervejaria - na síntese do composto tensoativo;
- Otimizar a relação carbono/nitrogênio e nível de agitação – na produção de biossurfactante em frascos agitados, através de planejamento experimental usando para a análise o programa *Statistica 5.0*;
- Determinar o efeito da agitação na variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ );
- Determinar as cinéticas de crescimento, consumo do substrato e produção do biossurfactante nas condições otimizadas;
- Caracterizar parcialmente a molécula do biossurfactante produzido comparativamente a um produto comercial;
- Estudar a estabilidade do biossurfactante, quanto a sua propriedade tensoativa, em diferentes valores de pH e temperatura.

\* *Landfarming* - é uma tecnologia de remediação de solos que reduz a concentração de petróleo do solo através da biodegradação. Essa tecnologia é feita a partir de uma fina camada do solo contaminado sobre uma superfície impermeabilizada, estimulando a atividade aeróbica microbiana nesse solo adicionando minerais, nutrientes e proporcionando a aeração (EPA, 2005).

## CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Surfactantes

Os surfactantes são compostos anfífilicos, orgânicos ou organometálicos, que se caracterizam por apresentar em sua estrutura um grupo apolar ou hidrofóbico (cauda) e um polar ou hidrofílico (cabeça). Na Figura 2.1 tem-se a representação de uma molécula de surfactante (PORTER, 1994).



**Figura 2.1.** Representação esquemática da estrutura de um surfactante (PORTER, 1994).

A porção apolar é frequentemente formada por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas (linear ou ramificada), 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 (HELENIUS e SIMONS, 1975; LICHTENBERG *et al.*, 1983).

O grupamento polar dos surfactantes sintéticos, de acordo com a carga apresentada, permite classificá-los em: aniônico (carga negativa); catiônico (carga positiva); não iônico (não possui carga) e zwitteriônico ou anfótero (ambas as cargas). A Tabela 2.1 apresenta diferentes tipos de surfactantes sintéticos.

A parte hidrofóbica da molécula é responsável pelas propriedades dos surfactantes. Assim, dependendo da sua estrutura molecular, os surfactantes podem apresentar propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e/ou microemulsões, dispersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou antiespumante, solubilidade, molhabilidade ou detergência. Segundo PORTER (1994), os surfactantes apresentam comportamentos diferenciados em função do número de grupamentos metil  $(CH_2)_n$ :

- $n < 8$ : a molécula é totalmente solúvel em água possuindo baixas propriedades como surfactante.

- $10 < n < 18$ : a molécula é pouco solúvel em água apresentando altas propriedades como surfactante.
- $n > 18$ : a molécula é praticamente insolúvel em água e, portanto, a propriedade como surfactante é inexpressiva.

**Tabela 2.1** Exemplos de surfactantes comerciais

<b>Tipo</b>	<b>Surfactante</b>
Aniônico	Estearato de sódio; dodecil sulfato de sódio (SDS); dihexadecil fosfato; brometo de dodeciltrimetil amônio
Catiônico	Cloreto de laurilamida; cloreto de trimetil dodecilamônio; sais quaternários de amônio
Não iônico	Polioxietileno dodecanol; polioxietileno p-ter-octil fenol (triton X-100); aquilfenol etoxilato;
Zwitteriônico	Dodecilbetaina; lauramidopropil betaina; dodecildimetil amônio propano sulfato

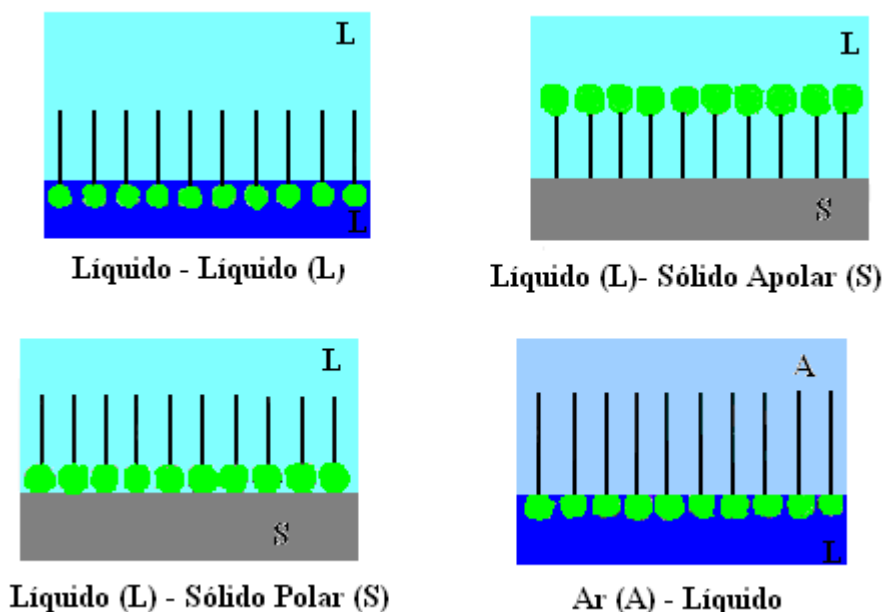
Fonte: SCHRAMM (2000) *apud* BAPTISTA (2007); MANIASSO (2001).

### 2.1.1 Propriedades dos Surfactantes

A solubilidade e as propriedades de um surfactante são dependentes da sua estrutura química e estão relacionadas, embora não seja uma interação simples. A seguir serão descritas as propriedades desses compostos.

#### Adsorção/Absorção

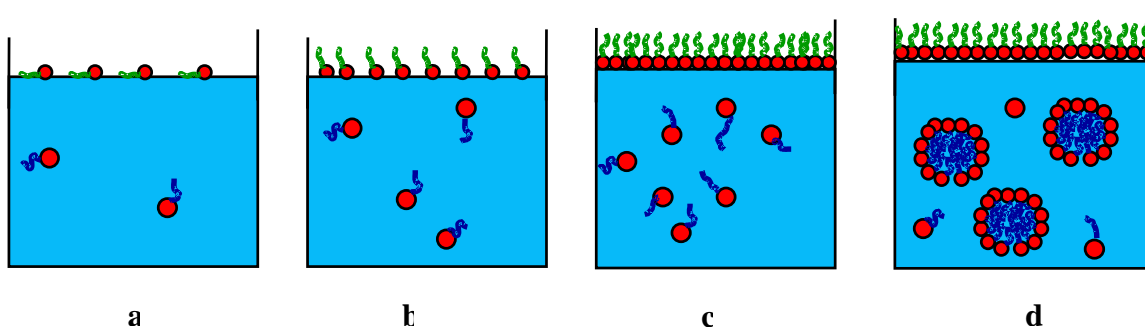
As moléculas de surfactantes, dadas as suas características, quando em solução, se distribuem na superfície de um líquido, diminuindo a sua tensão superficial. Este fenômeno ocorre nas interfaces líquido/líquido, líquido/sólido e líquido/ar, sendo denominado por sorção, que compreende os termos absorção (líquido/líquido) e adsorção (líquido/sólido) (PORTER, 1994). A Figura 2.2 apresenta algumas formas de sorção de moléculas de surfactante em diferentes interfaces. Por exemplo, a absorção de elevada quantidade de surfactante em água ocasionará a total cobertura da superfície do fluido, resultando em mudanças nas propriedades físicas do líquido. A presença de um agente tensoativo em solução leva à formação de gradientes de concentração, sendo a concentração do surfactante na superfície muito maior do que no seio do líquido (PORTER, 1994).



**Figura 2.2.** Representação da adsorção ou absorção de moléculas de surfactante em diferentes sistemas. Fontes: modificado de PORTER, 1994.

### Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração do surfactante interfere na intensidade de sua adsorção a uma dada superfície. Na Figura 2.3, pode-se observar as variações na ordenação das moléculas que ocorrem pela adição do surfactante em um líquido. Em concentrações muito baixas de surfactante, as moléculas tendem a se orientar paralelamente à superfície do líquido. O aumento da concentração do surfactante diminui a área disponível para as moléculas e, conseqüentemente, tem início uma ligeira ordenação das mesmas em relação à superfície. A orientação das moléculas depende, sobretudo, da natureza hidrofílica/hidrofóbica da superfície (PORTER, 1994). Numa determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), a quantidade disponível de moléculas do surfactante propicia a formação de uma única camada unidirecional (PORTER, 1994). Acima da CMC, é favorecida a formação de micelas.



**Figura 2.3.** Efeito da concentração de um surfaciante na adsorção em superfícies hidrofóbicas (a-muito baixa; b-baixa; c-CMC; d-acima da CMC). Fonte: modificado de PORTER, 1994.

As micelas são agregados moleculares, com regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que dinamicamente e espontaneamente se associam em solução aquosa, a partir de uma determinada concentração, dita crítica. As micelas não são estáticas, co-existindo em um equilíbrio dinâmico, mas são termodinamicamente estáveis e facilmente reprodutíveis, sendo destruídas por diluição em água quando a concentração do tensoativo ficar abaixo da CMC (ROSEN, 1978 *apud* MANIASSO, 2001). Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros; porém quando a concentração está próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas. Em concentrações acima da CMC, as micelas possuem um diâmetro entre 3 e 6 nm, o que representa de 30 a 200 monômeros. A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia hidrofóbica) e das condições experimentais (força iônica, temperatura, etc). A combinação destas propriedades distintas confere à molécula características únicas na dissolução aquosa, permitindo a formação de emulsões.

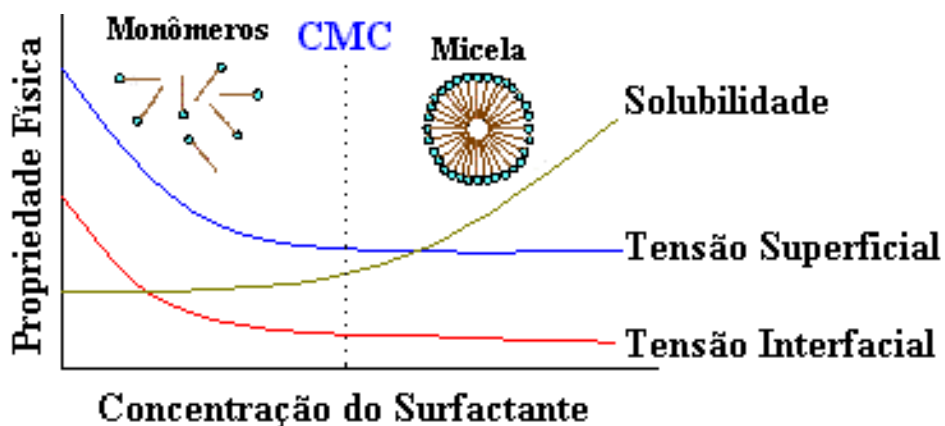
O processo de formação dos agregados ocorre num intervalo pequeno de concentrações, e pode ser detectado pela variação brusca produzida em determinadas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do tensoativo, como a tensão superficial.

Segundo ROSEN (1978), existem duas classes de materiais que afetam a concentração micelar crítica:

- classe 1: os que se incorporam às micelas;
- classe 2: responsáveis por modificar as interações solvente-micela ou solvente-surfactante.

A partir do ponto em que a CMC é alcançada, verifica-se que a tensão superficial se mantém constante, mesmo que haja um aumento na concentração do surfactante. Este

fenômeno está representado na Figura 2.4. Portanto, a redução da tensão superficial ou interfacial indica a propriedade tensoativa de um dado composto, mas não pode ser usada como critério de quantificação.



**Figura 2.4.** Variação da tensão superficial em função da concentração de surfactante indicando o ponto correspondente à concentração micelar crítica (CMC). Fonte: BAPTISTA (2007).

A Tabela 2.2 apresenta alguns surfactantes sintéticos comercialmente utilizados e os respectivos valores de tensão superficial.

**Tabela 2.2.** Surfactantes sintéticos e respectivos valores de tensão superficial

SURFACTANTE	TENSÃO SUPERFICIAL (Mn/m)
Dodecil-sulfato de sódio	37.0
Tween 20	30.0
Sulfato de alquil-benzeno	47.0

Fonte: CHRISTOFI e IVSHIVA (2002).

### Solubilidade

A solubilidade está diretamente relacionada à estrutura do composto, já que um aumento da massa molecular do grupo hidrofóbico ou do grupo hidrofílico torna o surfactante menos ou mais solúvel em água, respectivamente. Para a maioria dos compostos orgânicos, a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura. Entretanto,

a solubilidade dos surfactantes é dependente de certa temperatura chamada de ponto Krafft e do ponto de turvação (PORTER, 1994).

O ponto Krafft corresponde à temperatura na qual ocorre um aumento brusco da solubilidade do surfactante. Nesta temperatura, os monômeros e as micelas estão em equilíbrio em solução, de tal modo que a solubilidade do surfactante é igual à CMC.

O ponto de turvação corresponde à temperatura que torna turva a solução de surfactante. Este fenômeno ocorre quando soluções de surfactantes (não iônicos ou anfóteros), em concentrações acima da CMC, são aquecidas (PORTER, 1994).

### **Formação de emulsões**

Emulsificação é a propriedade que alguns biossurfactantes apresentam em promover a dispersão de um líquido em outro, através da formação de gotículas cujo diâmetro varia de 0,1 a 100 nm; quanto menor o diâmetro, mais estável será a emulsão formada (ZAJIC e SEFFENS, 1984).

No entanto, os surfactantes quimicamente sintetizados não são biodegradáveis e apresentam diferentes graus de toxicidade (BANAT, 1995). Os compostos catiônicos são os mais nocivos, mas devido à sua potencial ação bactericida têm sido extensivamente usados como biocidas em sistemas de resfriamento industrial para o controle da formação de biofilmes. Comparativamente, os compostos aniônicos são os menos tóxicos, seguidos dos não iônicos, cujo grau de toxicidade é função de sua estrutura química (KANTIN, 1980).

A criação de legislações mais rígidas de controle do meio ambiente levou à busca por compostos naturais com propriedades tensoativas como alternativas aos produtos comercialmente empregados.

## **2.2 Biossurfactantes**

Os compostos tensoativos de origem microbiana, também denominados biossurfactantes, apresentam estruturas semelhantes aos compostos de origem sintética. Portanto, são compostos anfipáticos, cuja parte hidrofílica pode ser composta por aminoácidos ou peptídeos, ânions ou cátions, éster ou carboidratos. A parte hidrofóbica, freqüentemente é formada por hidrocarbonetos saturados ou insaturados, com 10 a 18 átomos de carbono, ácidos graxos hidroxilados e seus derivados como ácidos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxi-graxos, compostos anfófilicos, e peptídeos com alta proporção hidrofóbica

(GEORGIU, LINS e SHARMA, 1992). A maioria dos biossurfactantes compreende compostos neutros ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros (BOGNOLO, 1999).

No fim da década de 60 surgiram os principais estudos demonstrando a capacidade de alguns microrganismos de produzir biossurfactantes (ARIMA *et al.*, 1968; KAKINUMA *et al.*, 1969). Atualmente, sabe-se que diversas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de sintetizar uma grande variedade destes bioprodutos.

### **2.2.1 Tipos de Biossurfactantes**

Os principais tipos de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores estão listados na Tabela 3. Alguns, como é o caso de ramnolipídios, lipopeptídios, Alasan, e Emulsan, já são produzidos comercialmente. Segundo Banat (2000), a produção dos biossurfactantes é de cerca de 3 milhões de toneladas por ano.

Nitschke e Pastore (2002) também incluem os biossurfactantes particulados, constando das próprias células ou vesículas que apresentem propriedades tensoativas.



**Tabela 2.3.** Principais tipos de biossurfactantes e respectivos microrganismos produtores

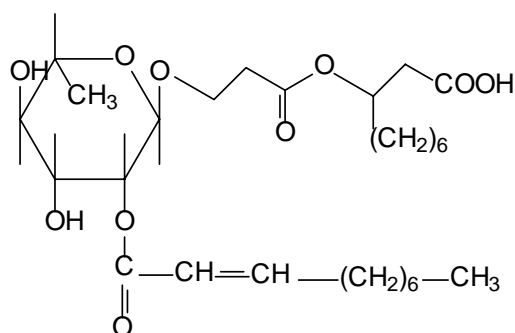
Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
<b>Glicolipídios</b>	
Ramnilipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Candida bombicola/ C. apícola/ C. petrophilum</i>
Trealolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis/ Mycobacterium sp.</i>
Celobioselípidios	<i>Ustilago maydis</i>
<b>Lipopeptídios e lipoproteínas</b>	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>
Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>
Surfactina/subtilisina	<i>B. subtilis</i>
Gramicidina	<i>Brevibacillus brevis</i>
Artrofactina	<i>Artrobacter sp</i>
<b>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios neutros	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
Flavolipídio	<i>Flavobacterium MTN11</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-ácido graxo	<i>Candida tropicalis</i>

Fonte: REIS (1998); MULLIGAN (2001); BODOUR *et al.* (2004).

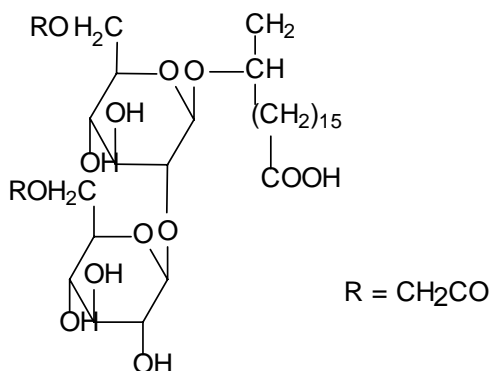
Os principais biossurfactantes serão descritos a seguir:

- *Glicolipídios:*

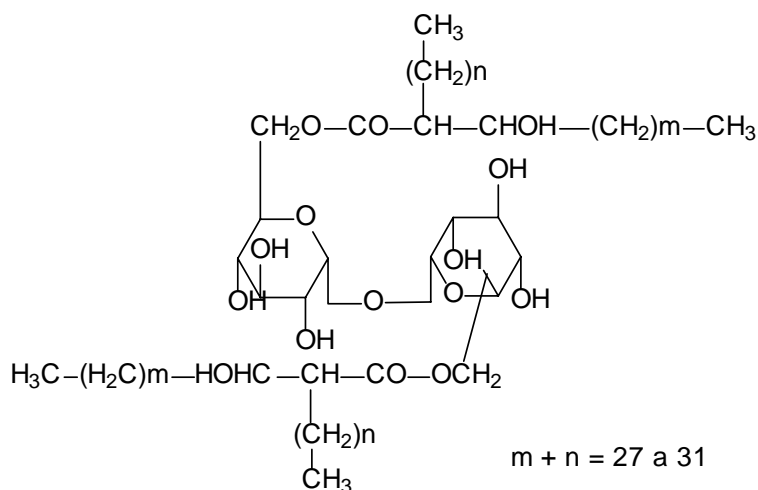
Estes compostos são os surfactantes microbianos mais estudados, constituídos por carboidratos associados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidroxi-alifáticos (DESAI e BANAT, 1997). Uma determinada espécie microbiana é capaz de produzir diferentes tipos de glicolipídios, dependendo da fonte de carbono disponível para seu crescimento (ZAJIC e STEFFANS, 1984). Para exemplificar, alguns glicolipídios estão representados nas Figuras 2.5, 2.6 e 2.7.



**Figura 2.5.** Ramnolipídio produzido por *Pseudomonas* sp. Fonte: HEALY *et al.* (1996).



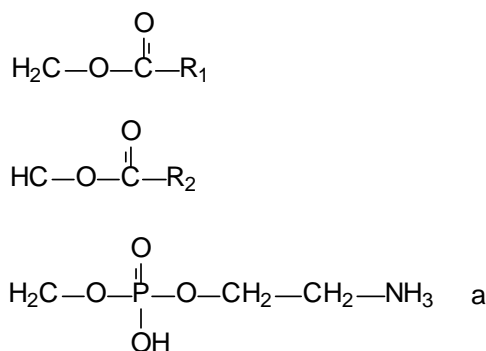
**Figura 2.6.** Estrutura do soforoselipídio produzido por *Candida bombicola*. Fonte: DESAI e BANAT (1997).



**Figura 2.7.** Estrutura de trealose lipídio produzido por *Rhodococcus erythropolis*. Fonte: DESAI e BANAT (1997).

- *Fosfolipídios:*

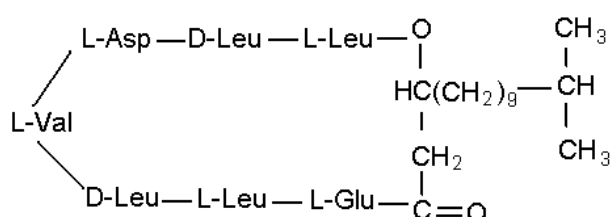
Estes biossurfactantes são formados por uma molécula de glicerol unida a dois ácidos graxos, através de ligações éster, e a um grupamento fosfato que pode apresentar diferentes substituintes (ZAJIC e SEFFENS, 1984). Quando determinadas espécies de bactérias ou leveduras são crescidas em meio com grandes concentrações de hidrocarbonetos, ocorre um aumento considerável do teor de fosfolipídios dentro das células microbianas; alguns destes fosfolipídios apresentam propriedades de biossurfactante (BOGNOLO, 1999). Na Figura 2.8 está representada a estrutura de biossurfactante do grupo dos fosfolipídios.



**Figura 2.8.** Estruturas de biossurfactantes produzidos por *Acinetobacter* sp. ( $\text{R}_1$  e  $\text{R}_2$  são cadeias de ácidos graxos; a- fostatidiletanolamina). Fonte: DESAI e BANAT (1997).

- *Lipopeptídios:*

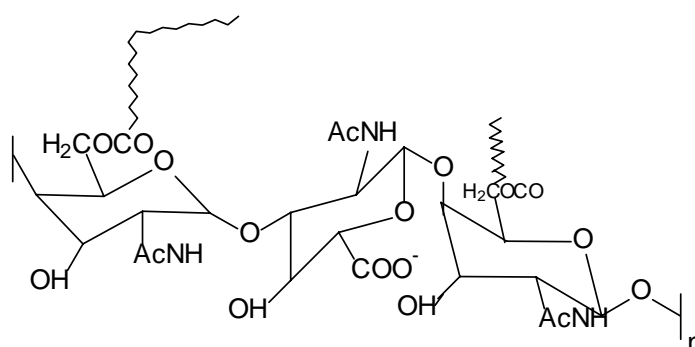
Estes compostos são produzidos por uma variedade de microrganismos como bactérias, sobretudo por actinomicetos, e leveduras. Destes os mais conhecidos são os produzidos por espécies do gênero *Bacillus*. Estas moléculas, além de apresentarem propriedades tensoativas, também possuem atividade antimicrobiana (HEALY *et al.*, 1996). Na Figura 2.9 está representada a estrutura de lipopeptídeo produzido pelo microrganismo *Bacillus subtilis*.



**Figura 2.9.** Estrutura de um lipopeptídeo (surfactina) produzido por *Bacillus subtilis*. Fonte: ARIMA *et al.* (1968); HEALY *et al.* (1996); MULLIGAN (2005).

- *Poliméricos:*

De um modo geral, estes polissacarídeos apresentam algumas proteínas ou ácidos carboxílicos em sua composição química (COOPER e PADDOCK, 1983). Segundo Kosaric *et al.* (1987), estas biomoléculas propiciam a formação de emulsões estáveis porque possuem uma alta afinidade por interfaces óleo/água. Na Figura 2.10, está representada a estrutura de um biossurfactante polimérico.



**Figura 2.10.** Estrutura geral do emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. Fonte: ZHANG *et al.* (1999).

### 2.2.2 Função Fisiológica dos Biossurfactantes

As moléculas dos surfactantes sintetizadas por via microbiana podem ser excretadas para o ambiente, ou podem ser constituintes da parede celular do próprio microrganismo produtor. Neste caso, a célula microbiana, por si só, pode apresentar significativa capacidade emulsificante. Muitos autores consideram que a célula intacta possuidora de capacidade emulsificante é por si só um biossurfactante, porém, apenas os biossurfactantes extracelulares têm o poder de reduzir a tensão superficial de uma fase aquosa. Adicionalmente, a ação solvente do hidrocarboneto na superfície lipofílica da célula pode causar a perda de sua integridade estrutural, liberando componentes tensoativos para o meio. De acordo com Francy *et al.* (1991), geralmente os microrganismos potencialmente produtores de biossurfactantes excretam estas macromoléculas para o meio.

Muitas vezes a função e, conseqüentemente, a produção dos biossurfactantes está relacionada com a assimilação de hidrocarbonetos pelos microrganismos. Todavia, a síntese desses compostos não é somente dependente da atividade dos microrganismos potencialmente degradadores de hidrocarbonetos. A função fisiológica exata dos biossurfactantes é ainda desconhecida, mas sabe-se que a maioria destes produtos é um metabólito secundário essencial para a sobrevivência da célula. Algumas suposições vêm sendo levantadas (LIN, 1996; SINGH e CAMEOTRA, 2004; VAN HAMME, SINGH, WARD, 2006):

a) Promover a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos (compostos imiscíveis com a água), facilitando o crescimento dos microrganismos. Abaixo da CMC, micelas de biossurfactantes são formadas permitindo que os substratos hidrofóbicos se aproximem das células microbianas e, por conseguinte, propiciem uma interação mais rápida com a membrana celular, resultando na entrega direta do substrato (VAN HAMME, SINGH e WARD, 2006);

b) Propiciar a ligação de hidrocarbonetos com a superfície dos microrganismos, permitindo o transporte desses compostos para o interior da célula. ROSENBERG (1993) descobriu que o emulsan, uma cápsula heteropolissacarídica, é usado pela espécie *Acinetobacter calcoaceticus* para facilitar o desprendimento de gotículas de óleo cru quando não há disponibilidade de fonte de carbono solúvel no ambiente;

- c) Permitir a aderência ou liberação de células de superfícies sólidas, podendo inclusive facilitar a interação com o hospedeiro. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade para encontrar novo habitat com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG e RON, 1999). Boles *et al.* (2005) sugerem ser essencial a presença dos ramnolipídios em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* para que as células bacterianas deles se desprendam e retornem à forma de vida planctônica.
- d) Promover a formação, a manutenção e a maturação de biofilme. Davey *et al.* (2003) *apud* Van Hamme, Singh e Ward (2006) mostraram que células de *P. aeruginosa* mutantes no gene *rhlA*, isto é, desprovidas da capacidade de produção de ramnolipídios, geram um biofilme anormal, constituindo um emaranhado denso de células.
- e) Favorecer o mecanismo de *quorum sensing*\* entre as células bacterianas, proporcionando a regulação de genes.
- f) Ação como antimicrobianos, já que vários microrganismos produzem substâncias de ação antagonista no final da fase exponencial de crescimento, como forma de auxílio na competição (amensalismo) por fontes nutricionais dentro das comunidades microbianas (VAN HAMME, SINGH e WARD, 2006).
- g) Função quelante através da ligação com metais pesados.

### 2.2.3 Características dos Biosurfactantes

Os surfactantes de origem microbiana possuem diversas vantagens em comparação aos surfactantes sintéticos como (COOPER, 1986; DESAI e BANAT, 1997; REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004; MULLIGAN, 2005):

**Baixa toxicidade** – comprovadamente não causam danos aos seres vivos. Atualmente, maior atenção tem sido dispensada aos biosurfactantes devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, sendo possível o seu emprego sem restrições em alimentos e produtos farmacêuticos e cosméticos;

\**Quorum sensing* - mecanismo de comunicação entre células bacterianas, geralmente é estimulado por mudanças nas condições ambientais ou populacionais (VAN HAMME, SINGH e WARD, 2006).

**Biodegradabilidade** - são facilmente degradáveis na água e no solo, que os tornam adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos;

**Compatibilidade com o ambiente** – apresentam reduzido ou nenhum impacto ambiental, o que permite inclusive a sua produção *in situ*;

**Seletividade**;

**Tolerância à temperatura, pH e força iônica** – apresentam atividade específica mesmo em valores extremos, o que permite uma aplicação mais abrangente já que podem ser usados em condições drásticas.

Em geral, os biossurfactantes possuem propriedades melhores que muitos surfactantes químicos, como: baixos valores de CMC e elevada atividade superficial e interfacial, de tal modo que mesmo em baixas concentrações são capazes de efetivamente reduzir os valores de tensão superficial ou interfacial (COOPER e PADDOCK, 1984; BANAT, 1995). Isto torna os biossurfactantes superiores em comparação com os detergentes aniônicos sulfatados sintéticos (NITSCHKE e PASTORE, 2003). A CMC dos biossurfactantes, uma medida de sua eficiência, varia entre 1-2000 mg/L, enquanto a tensão interfacial (óleo/água) e superficial é de aproximadamente 1 e 30 mN/m, respectivamente (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes podem apresentar baixo ou alto peso molecular. Os compostos tensoativos de baixo peso molecular apresentam uma maior eficiência em reduzir as tensões superficial e interfacial de fluidos, enquanto os surfactantes de alto peso molecular demonstram uma maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água. Na Tabela 2.4 encontram-se os principais biossurfactantes, classificados de acordo com sua massa molecular.

**Tabela 2.4.** Classificação dos principais biossurfactantes e respectivas massas molecular

Baixa Massa Molecular	Alta Massa Molecular
Ramnolipídios	Emulsan RAG-1
Trealoselipídios	Alasan
Surfactina	Liposan
Flavolipídios	Manana-lipídio proteína

Fonte: ROSENBERG e RON (1999).

## 2.3 Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*

### 2.3.1. Microrganismo

As células da espécie *Bacillus subtilis* são Gram-positivas, apresentando forma de bastonetes retos, 0,7 a 0,8 µm por 2,0 a 3,0 µm, e ocorrem predominantemente isoladas e raramente em cadeias. São móveis, por meio de flagelos polares e formam endosporos centrais, medindo de 0,8 µm por 1,5 a 1,8 µm. Estas bactérias podem ser encontradas em diversos ambientes, principalmente em solos (CLAUS e BERKELEY, 1984).

O gênero *Bacillus* compreende mais de 200 espécies com 34 espécies tipo (KENNETH, 2005). Em geral, a maioria das informações referentes à biologia, à bioquímica e à genética das bactérias Gram-positivas é decorrente do estudo de *B. subtilis*.

As colônias de *B. subtilis* apresentam características morfológicas muito variadas principalmente em função da composição do meio de cultura empregado para seu crescimento. Normalmente, as colônias desta espécie apresentam coloração creme ou marrom, são opacas, de forma redonda ou irregular (CLAUS e BERKELEY, 1984).

Esta espécie bacteriana é aeróbica facultativa, entretanto, na presença de nitratos pode crescer anaerobicamente. O crescimento deste microrganismo em meios complexos contendo glicose, na presença de oxigênio, é intenso com formação de 2,3-butanodiol, acetoína e CO<sub>2</sub> como principais produtos do metabolismo. Porém, em condição de anaerobiose, o crescimento é bem reduzido (CLAUS e BERKELEY, 1984).

É um microrganismo quimioheterotrófico, portanto cresce em meio mínimo constituído de glicose e sal amoniacal, como únicas fontes de carbono e nitrogênio. Na



presença de sacarose pode formar polissacarídeos extracelulares, como levana e dextrana. Em meios, contendo arabinose, xilose e manitol, ocorre a produção de ácidos orgânicos. Esta bactéria também é capaz de degradar macromoléculas como amido, pectina e caseína. A composição do meio de cultura também pode induzir a formação de pigmentos, bem como a síntese de polipeptídeos com ação antimicrobiana (CLAUS e BERKELEY, 1984).

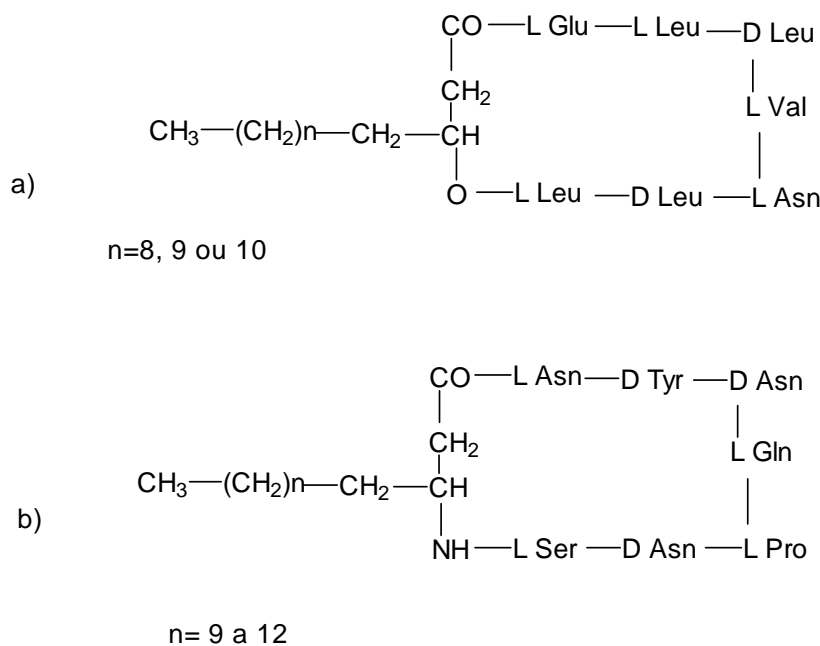
Esta bactéria apresenta a capacidade de crescer em amplas faixas de temperatura e pH. A faixa de temperatura para crescimento situa-se entre 10 e 50°C, embora temperaturas compreendidas entre 30 e 40°C sejam mais adequadas para seu cultivo. O seu crescimento é mais ativo na faixa de pH de 5,5 a 8,5 (CLAUS e BERKELEY, 1984).

### **2.3.2. Lipopeptídios produzidos por *Bacillus subtilis***

A espécie *Bacillus subtilis* produz uma variedade de lipopeptídios de baixo peso molecular, como: iturina A, liquenisina, fengicina e surfactina. Esses compostos são bastante conhecidos por apresentarem propriedades antimicrobianas e atividade tensoativa.

A iturina A é um biossurfactante não iônico, com propriedades tensoativas e emulsificantes (DELEU *et al.*, 1999; AHIMU, JACQUES e DELEU; 2002). No entanto, o principal bioproduto sintetizado por este microrganismo é a surfactina, também chamada de subtilisina, por ser considerado um dos mais efetivos biossurfactantes conhecidos (REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004). As estruturas da surfactina e da iturina A estão representadas na Figura 2.11 (BESSON e MICHEL, 1992; REIS, 1998).

A surfactina é composta por sete aminoácidos constituindo a parte hidrofílica e uma cadeia de ácido graxo como região hidrofóbica. Na literatura, existem relatos de que há pelo menos três tipos diferentes de surfactina em relação à cadeia peptídica: A, B e C (VATER *et al.*, 2002; SINGH e CAMEOTRA, 2004). A surfactina A possui L-leucina na posição de ligação com a parte hidrofóbica, enquanto nas moléculas de surfactina B e surfactina C, os aminoácidos correspondentes são L-valina e L-isoleucina, respectivamente. Estudos de espectrometria de massa também identificaram diferentes tipos de surfactina em relação à quantidade de carbono presente na parte hidrofóbica, variando entre 13 e 15 carbonos (VATER *et al.*, 2002).



**Figura 2.11.** Representação molecular dos lipopeptídios: (a) Surfactina e (b) Iturina A. Fonte: DELEU *et al.* (1999).

As variações presentes nas estruturas dos diferentes tipos de surfactina relatados são dependentes das condições operacionais do processo fermentativo, bem como da linhagem de *B. subtilis* selecionada para a produção. As mudanças na estrutura molecular alteram as propriedades do bioproduto e, conseqüentemente, o seu campo de aplicação. Além disso, a produção pode ser afetada quantitativamente, já que os fatores ambientais influenciam acentuadamente a produção de biosurfactantes e estão diretamente relacionados à atividade metabólica dos microrganismos (DESAI e BANAT, 1997).

A surfactina tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água a valores inferiores a 30 mN/m, em baixas concentrações, como por exemplo 0,005% (m/v) (Mulligan, 2005). Além disso, este composto apresenta propriedades tensoativas e emulsificantes que permitem seu uso nas mais diversas aplicações em diferentes setores industriais, destacando a sua aplicação como auxiliar na biorremediação de ambientes poluídos. Existe ainda a possibilidade do seu emprego na área terapêutica por conta da baixa citotoxicidade constatada para células de mamíferos. De acordo com Davis, Lynch e Varley, 1999; Shigh e Cameotra, 2004; Kim *et al.*, 2007, as atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais destes compostos podem ser atribuídas à:

- Indução da formação de canais de íons na bicamada lipídica da membrana celular;

- Inibição da formação de coágulos;
- Inibição da adenosina monofosfatase cíclica (cAMP);
- Inativação do envelopamento dos retrovírus e Herpesvírus humano (HHV- 1 e HHV-2);
- Funções anti-inflamatório e anti- tumoral;
- Anti-hipercolesterolêmico.

No mercado mundial, estes produtos tensoativos naturais já estão disponíveis. Por exemplo, a Sigma comercializa surfactina a cerca de R\$ 60,00, o miligrama. A empresa AIBI\* (Agriculture University of Genbloux, Bélgica) disponibiliza o produto na internet por € 8,00/mg. No entanto, como consequência do seu elevado custo, esse produto ainda não é competitivo em relação aos surfactantes sintéticos.

\* AIBI- Aide a l' Innovation dans Bio-Industries.

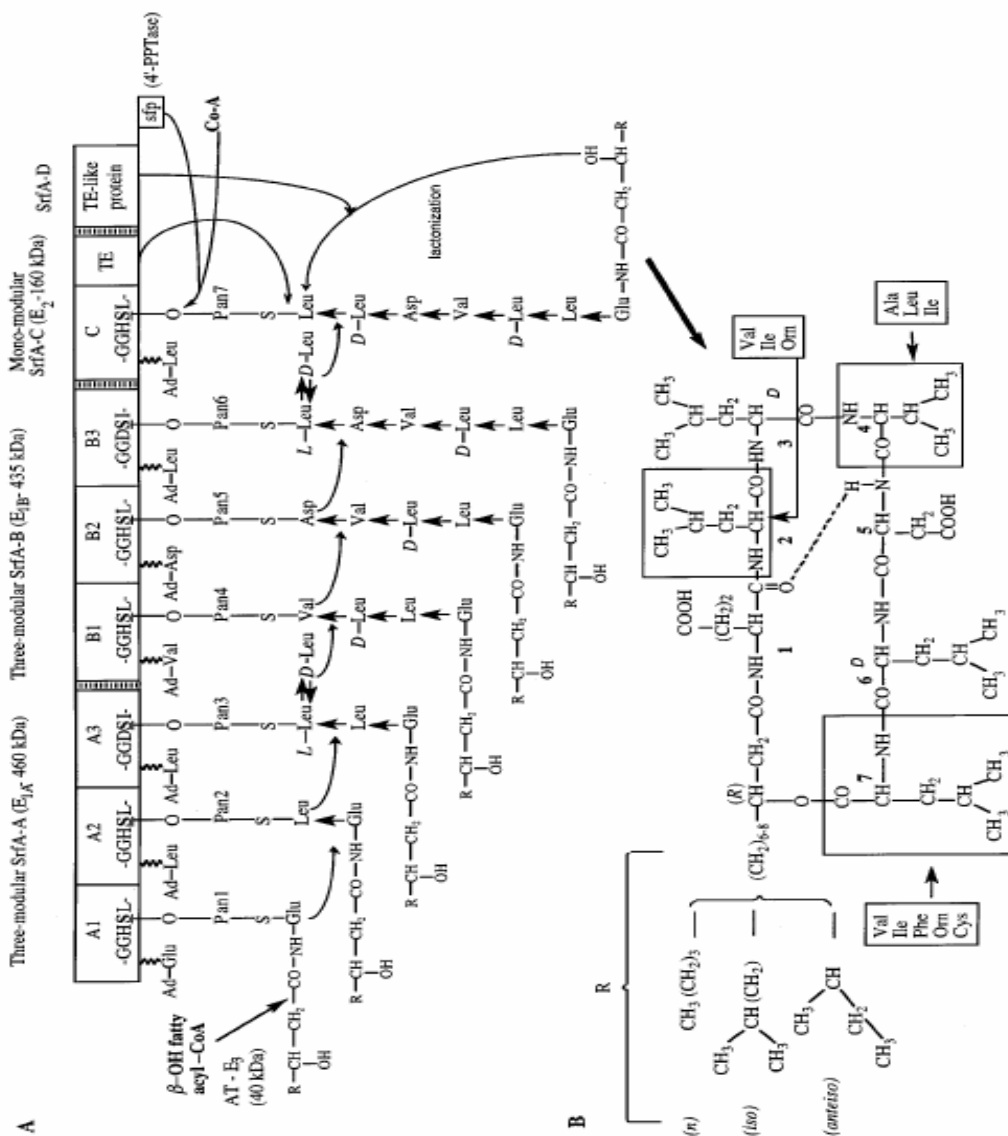
No Brasil, ainda não é produzido o biossurfactante purificado. No entanto, atualmente, existem seis empresas que detêm o registro de 13 produtos remediadores no IBAMA<sup>1</sup> (Resolução CONAMA<sup>2</sup> n°. 314/2002), sendo que 12 deles possuem, em sua composição ativa, uma mistura de bactérias e fungos, acrescida ou não de enzimas. Como mencionado, a composição dos biorremediadores pode ser bastante variada, contudo, nos produtos registrados são encontrados, em sua maioria, *Bacillus subtilis* (58%), *Bacillus licheniformis* (50%) e *Roseobacter litoralis* e *Bacillus megaterium* (33%) (SERAFIM *et al.*, 2007).

### 2.3.3. Biossíntese da surfactina

Os primeiros estudos da biossíntese da surfactina começaram a partir dos trabalhos de KLUGE *et al.* (1988), que propuseram ser a sua síntese um mecanismo não ribossomal catalisado por um complexo multienzimático. Por este mecanismo são sintetizados enzimaticamente peptídeos a partir de substratos, em alguns casos, não protéicos. Muitas vezes, estes peptídeos apresentam aminoácidos não usuais, incluindo aminoácidos não protéicos ou modificados, sem a participação direta do RNA e DNA na sua síntese (FEDRIZZI, 2006).

1. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais  
2. Conselho Nacional do Meio ambiente

O complexo multifuncional da surfactina sintetase é um reflexo da sua organização genética (PEYPOUX, BONMATIN e WALLACH, 1999). Um dos genes requeridos para biossíntese está em um grande operon de 25 kb, denominado *surf A*. Este operon também é responsável pela esporulação e a indução do estado de competência bacteriana. Neste operon são encontrados quatro ORF<sup>3</sup> modulares: ORF1 (*surf A-A*), ORF2 (*surf A-B*), ORF3 (*surf A-C*) e ORF4 (*surf A-D*). A Figura 2.12 mostra o esquema completo da biossíntese da surfactina.



**Figura 2.12.** Esquema da síntese da surfactina. Fonte: VOLLENBROICH *et al.*, 1994.

A ORF1 (*srfA-A*) é responsável pela a codificação de três enzimas - E<sub>1A</sub>, E<sub>1B</sub> e E<sub>2</sub> - necessárias para fazer a seqüência dos heptapeptídeos (VOLLENBROICH *et al.*, 1994). As duas regiões nucleotídicas, onde a enzima L-leucina epimerase é codificada, estão localizadas na terceira porção dos genes *srfA-A* e *srfA-B*. (PEYPOUX, BONMATIN e WALLACH, 1999).

O gene *sfp* que está associado ao *operon srfA*, mas não integrado a ele, é o segundo gene essencial para a produção da surfactina. Este codifica a superfamília fosfospanteteiniltransferase (4PPTase) que funcionam como *primers* para o peptídeo não ribossomal

A expressão do operon *sfrA* é induzida depois da fase exponencial de crescimento e é dependente do gene *comA* (previamente designado de *sfrB*). A atividade do produto deste gene, referendado como ComA, é regulada, através, da fosforilação, pela proteína quinase ComP. As proteínas ComA e ComP formam um complexo capaz de se ligar diretamente com o promotor do operon *sfrA* e agir como regulador positivo em resposta aos níveis de glicose e glutamina no meio.

## **2.4 Parâmetros que influenciam a produção da surfactina**

Apesar das vantagens dos biossurfactantes comparativamente aos compostos tensoativos de origem microbiana, a sua comercialização é ainda muito limitada, devido especialmente ao alto custo da produção. Na Tabela 2.5 são apresentados os custos relativos às produções dos surfactantes químicos e dos biossurfactantes.

Uma forma de implementar a redução dos custos de produção dos biossurfactante é fazer uso de matérias-primas renováveis, abundantes e de baixo custo. É ainda economicamente mais vantajoso, se for possível, efetuar a substituição total, ou pelo menos parcial, dos componentes do meio por efluentes ou subprodutos agroindustriais regionais na sua formulação, desde que não sejam requeridos tratamentos prévios onerosos a fim de adequar o substrato para o microrganismo (SINGH, VAN HAMME e WARD, 2007). A reintrodução de rejeitos na cadeia produtiva tem como vantagens a redução do custo de produção, visto a sua grande disponibilidade e baixo preço e, sobretudo, a redução do seu descarte, causa de graves problemas ambientais futuros.

\* open read frame

Adicionalmente, o aproveitamento de efluentes é um ponto importante para as indústrias geradoras, já que a redução da quantidade a ser tratada reflete em minimização dos custos necessários para adequá-los às normas de descarte segundo a legislação vigente. Porém, o uso de rejeitos industriais implica em ônus na etapa de recuperação do produto, uma vez que a sua baixa concentração e a presença de vários outros compostos no mosto fermentado implicam na necessidade de várias etapas de separação, e purificação quando necessária.

**Tabela 2.5.** Comparação do custo comercial dos surfactantes químicos e biosurfactantes

<b>Tipo</b>	<b>Custo (US\$/kg)</b>
<b>Biosurfactantes</b>	
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	12,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,90
<i>Candida bombicola</i>	2,80
<i>Bacillus subtilis</i>	20,30
<b>Surfactantes</b>	
Dodecilbenzeno (detergente alquilado)	1,03
Lauril sulfato de sódio 30%	0,95
98%	26,00

Fonte: ANNA (2002) *apud* BAPTSTA (2007).

Logo, para obter a melhor estratégia do ponto de vista econômico, é necessário desenvolver uma tecnologia bem definida, através da otimização de todos os parâmetros envolvidos no processo, desde a seleção de linhagens microbianas potencialmente produtoras do composto tensoativo, preparo do inóculo, condições e condução do processo fermentativo, considerando inclusive os procedimentos relativos à etapa de recuperação do produto do mosto fermentado e sua posterior purificação. Conforme demonstrado por ISA *et al.* (2007), a recuperação e a purificação são os maiores obstáculos para a comercialização dos biosurfactantes, sendo responsável por 60% do total do custo de produção.

Os fatores que afetam a produção do composto tensoativo, quali e quantitativamente, são (FIETCHER, 1992):

- Microrganismo e linhagem produtora;
- Natureza da fonte de carbono;

- Possíveis limitações nutricionais;
- Parâmetros físico-químicos do processo (aeração, temperatura e pH).

#### **2.4.1. Fonte de Carbono**

Com relação à fonte de carbono, é sabido que os compostos tensoativos, muitas vezes, são produzidos somente quando os microrganismos são cultivados na presença de hidrocarbonetos. Entretanto, em alguns casos os biosurfactantes podem ser produzidos a partir de substratos simples, solúveis em água, como os carboidratos (LIN, 1996).

De fato, a síntese de biosurfactantes a partir de carboidratos apresenta algumas vantagens como: uso de matérias-primas renováveis e possibilidade de modificação da estrutura do composto tensoativo, o que irá refletir em modificação das propriedades e, portanto, no desenvolvimento de produtos para aplicações específicas. Além disso, o emprego de carboidratos, comparativamente ao de hidrocarbonetos, é mais interessante visto que operacionalmente os processos fermentativos são mais facilmente conduzidos (REIS, 1998).

Vários estudos têm sido conduzidos em vários países a fim de verificar a possibilidade do emprego de matérias-primas regionais de baixo custo e facilmente disponíveis como alternativa para produção de surfactina. Alguns trabalhos demonstraram a possibilidade do uso de: efluente de uma fábrica de azeite de oliva (MERCADÉ e MANRESA, 1994); subprodutos industriais, como soro de leite e extrato de turfa (MERCADÉ *et al.*, 1993); vinhoto, caldo de cana, açúcar cristal e melão (REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004); soro de leite, melão e manipueira (NITSCHKE e PASTORE 2003); resíduo líquido proveniente da fabricação de farinha de mandioca (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

A fonte de carbono empregada tem influência no tipo e na quantidade de biosurfactante produzido, visto que propicia alterações na composição química da molécula, conduzindo à variação nas suas propriedades físico-químicas (GEORGIU, LINS e SHARMA, 1992). Por isso, a escolha da matéria-prima deve levar em conta custo, disponibilidade e características nutricionais do microrganismo, mas sobretudo, o tipo de aplicação que se pretende do biosurfactante a ser produzido. A seguir, uma breve descrição dos resultados já publicados por diferentes autores.

Quando *Bacillus subtilis* ATCC 21332 foi cultivado em caldo nutriente, observou-se baixa produção de surfactina. No entanto, quando o cultivo foi realizado em meio contendo como fonte de carbono glicose e adicionado de sais minerais, o biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 62 para 27 mN/m e a tensão interfacial contra hexadecano de 22 para 1 mN/m. A adição de hexadecano ao meio de produção favoreceu o crescimento celular, porém inibiu a síntese da surfactina (COOPER *et al.*, 1981).

Banat (1993) estudou a utilização de glicose e ácido oléico como substrato para o crescimento da cepa termofílica *Bacillus* sp., obtendo baixos valores de tensão superficial e interfacial no mosto, respectivamente de 27-29 dina/cm e 1,5 dina/cm. Notou-se também que a biomolécula produzida foi capaz de emulsionar, de forma eficiente, querosene e outros hidrocarbonetos.

Fox e Bala (2000) verificaram a produção de surfactante pela linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332 utilizando como fonte de carbono amido de diferentes matérias-primas comerciais como aveia, milho, arroz e batata. Todas as fontes de carbono testadas permitiram que a bactéria produzisse o biossurfactante, reduzindo significativamente a tensão superficial do meio.

Murkhejee e Das (2005) avaliaram a produção do biossurfactante pelas linhagens de *B. subtilis* DM-03 e DM-04, ambas isoladas de solo contaminado, em meios contendo glicose, glicerol, amido e hidrocarbonetos alifáticos (octano, dodecano, hexadecano, parafina líquida, diesel e querosene). Segundo os autores, as maiores variações de tensão superficial foram determinadas nos meios contendo os substratos solúveis, sendo que hexadecano foi a única fonte insolúvel capaz de induzir redução da tensão superficial por uma das linhagens similar às fontes solúveis. Os dados referentes ao levantamento bibliográfico acima apresentados foram compilados visando facilitar a análise (Tabela 2.6).



**Tabela 2.6.** Parâmetros determinados na produção de biossurfactantes por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*

Linhagem	Matéria- prima	Tensão superficial final (mN/m)	Outros parâmetros	Referências
LB5a	Manipueira	36,6	CMC: 33 mg/L	NITSCHKE e PASTORE (2006)
sp.	Glicose	27	Tensão interfacial: 1mN/m	COOPER (1981)
sp. Termofílica	Glicose e ácido oléico	27-29	N.A	BANAT (1993)
ATCC 21332	Efluente da indústria de batata	28,3 <sup>a</sup> -34,2 <sup>b</sup>	N.A	FOX e BALA (2000)
MTCC 2423	Melaço	29	45°C	MAKKAR e CAMEOTRA, 1997
DM-03	Glicerol	N.A	Redução da tensão no meio: 37,2 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
DM-03	Querosene	N.A	Redução da tensão no meio: 2,6 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
DM-04	Diesel	N.A	Redução da tensão no meio: 10,9 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
DM-04	Amido	N.A	Redução da tensão no meio: 24,3 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
R1	Melaço	30,1	Temperatura: 45°C	JOSHI, <i>et al.</i> , 2008
ATCC 6633	Vinhoto	35,3	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
ATCC 6633	Caldo de cana	34,8	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
ATCC 6633	Açúcar cristal	30,6	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
ATCC 6633	Melaço	34,4	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
LB5a	Soro de leite	48,8	N.A	NITSCHKE e PASTORE, 2003
LB5a	Melaço	29,5	N.A	NITSCHKE e PASTORE, 2003

\*a (resíduo líquido); b (resíduo sólido) NA – não apresentado

## Açúcar cristal

Devido à sua biodiversidade, o Brasil é uma fonte inestimável de recursos naturais renováveis que possibilitam a formulação de meios de cultivo a um baixo custo. Historicamente, a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. O seu cultivo é mais propício em clima tropical onde se alternam as estações secas e úmidas; sua floração, em geral, começa no outono e a colheita se dá na estação seca, o que representa um período de safra de 3 a 6 meses. O nosso país, em quase toda a sua extensão, apresenta as condições climáticas para o cultivo da cana, que atualmente, vem sendo cultivada nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste; é nesta última, sobretudo no estado de São Paulo, onde é maior a produção.

De acordo com levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) da safra 2006/2007, a cana-de-açúcar ocupa hoje 6,1 milhões de hectares no Brasil, e São Paulo continua sendo o maior produtor, com mais da metade desta área. As estimativas são de que a produção de cana-de-açúcar baterá novamente recorde na safra 2008/09, que deverá ser de 532,5 milhões de toneladas, o que representa um crescimento de 9,7% em relação à safra anterior. Segundo Eduardo Pereira de Carvalho, presidente da União da Agroindústria Canavieira de São Paulo (Única), a safra de cana no país deverá crescer em cerca de 50% durante os próximos anos para cerca de 730 milhões de toneladas, enquanto a extensão das áreas plantadas terá um expansão de 45%, atingindo 9 milhões de hectares (Folha de São Paulo, 03 de julho de 2007).

O Brasil é o maior produtor de açúcar de cana do mundo, com os menores custos de produção e também, o maior exportador do produto, embora a metade da produção brasileira seja destinada ao mercado interno. A cana de açúcar pode ser considerada como a principal fonte de biomassa energética, representado por 350 indústrias de açúcar e álcool e 1.000.000 empregos diretos e indiretos em todo o Brasil. Em valores médios, da quantidade de cana produzida no Brasil são gerados 55% de álcool e 45% de açúcar (SEVERO, 2004).

Para a fabricação de açúcar cristal usando cana de açúcar, o vegetal é moído para extração do caldo, que é aquecido a 105°C e, a seguir, filtrado para remoção das impurezas. Segue-se, a evaporação do caldo em evaporadores de múltiplo estágio e, por fim, a deposição em bandejas de grande relação área/volume onde haverá a formação dos cristais. Para obtenção do açúcar cristal, após evaporação, o caldo sofre um refinamento leve, que retira 90% dos sais minerais.

Por conta do custo, disponibilidade em várias regiões do país, facilidade de transporte e armazenamento, o açúcar cristal tem sido uma matéria-prima convencionalmente empregada em diferentes bioprocessos industriais.

#### **2.4.2 Fonte de Nitrogênio**

Além da fonte de carbono, atenção deve ser dada à fonte de nitrogênio e a presença de elementos traços, uma vez que igualmente influenciam o custo, a produção e a qualidade dos biossurfactantes produzidos (ATLAS, 1981; COOPER *et al.*, 1981 a, b; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984 e 1986; HAFERBUG *et al.*, 1986; ABU-RUWAIDA *et al.*, 1991; MURKHEJEE e DAS, 2005). Segundo alguns destes autores, a adição de nitrogênio pode tanto estimular quanto inibir a produção de compostos tensoativos pelos microrganismos. Davis, Lynch e Varley (1999) demonstraram que o crescimento do microrganismo em condições limitantes de nitrogênio é extremamente importante para a otimização do processo de produção de muitos metabólitos secundários. Dentre os trabalhos já realizados utilizando diferentes fontes de nitrogênio citam-se: nitrato de amônio (ROUBIEN *et al.*, 1989;), uréia (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997), triptona (MURKHEJEE e DAS, 2005), substâncias orgânicas nitrogenadas, como extrato de lêvedo e diferentes aminoácidos (asparagina, ácido aspártico e ácido glutâmico) (KOSARIC, 1996).

#### **2.4.3 Sais Minerais**

Poucos estudos foram feitos para determinar a importância qualitativa e quantitativa de elementos traços. Uma das primeiras publicações envolvendo uma abordagem sobre o tema, data de 1981. Este estudo realizado *Bacillus subtilis* ATCC 21332 mostrou a influência de vários metais na produção de lipopeptídeo; houve um estímulo da síntese de surfactina quando ao meio foi adicionado sais de ferro ou de manganês (COOPER *et al.*, 1981). Mais recentemente, Wei e Chu (2002) verificaram que a adição de  $Mn^{+2}$  ao meio favorece o crescimento celular e, principalmente, a produção da surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Incrementos na produção de biossurfactante também foi observado por Reis, Sérvulo e de França (2004) a partir da fermentação de *B. subtilis* ATCC 6633 em meio contendo quantidades mínimas de sais minerais.

Interessante notar, que além da surfactina ser estável em ampla faixa de salinidade, a bactéria é capaz de sintetizá-la em meios contendo diferentes concentrações de NaCl. Lin *et al.* (1994) não notaram alterações na produção da biomolécula por *B. subtilis* JF2 em meios onde a concentração de NaCl, variou entre 5 e 20 g/L. Resultado semelhante foi obtido por Makkar e Cameotra, (1997) obtiveram realizado semelhante com outra cepa de *Bacillus subtilis*, utilizando concentrações de NaCl de 0,1 a 40 g/L. Esta bactéria reduziu a tensão superficial do meio de 68 para 28 mN/m em todas as concentrações de NaCl testadas, embora houve um decréscimo na sua produção quando foi utilizado 40 g/L de NaCl.

#### **2.4.4 Condições Ambientais**

Os fatores ambientais como temperatura, agitação, pH e disponibilidade de oxigênio devem ser ajustados e controlados no decorrer do bioprocessamento, pois influenciam a produção de biosurfactante através de seus efeitos no metabolismo celular (DESAI e BANAT, 1997).

Ohono *et al.* (1995) verificaram que a produção de surfactina por uma linhagem recombinante de *Bacillus subtilis* MI113 atingiu seu valor máximo à 37°C, ocorrendo queda de rendimento do biosurfactante em temperaturas superiores e inferiores. No entanto, Joshi *et al.* (2008) constataram ser possível a síntese de surfactina pela linhagem *B. subtilis* R1 na temperatura de 45°C, quando foram obtidos valores de tensão superficial em torno de 30 mN/m.

Em relação à influência do pH, foram alcançados valores máximos de biosurfactante na faixa de pH de 6,5 a 10,5. Porém, uma queda expressiva do rendimento foi observada quando o pH do meio de cultivo foi ajustado em 4,5 (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997).

Quanto ao oxigênio dissolvido, Lin *et al.* (1994) mostraram que a síntese do lipopeptídeo, pela linhagem *B. subtilis* JF2, é afetada pela concentração de O<sub>2</sub> dissolvido, sendo altamente inibido por teores de O<sub>2</sub> dissolvido a 80%. No entanto, Javaheri *et al.* (1985) observaram anteriormente que esta linhagem foi capaz de produzir um biosurfactante aniônico, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, ocasionando o decréscimo da tensão superficial do meio de 70 para 28 mN/m.

Desta forma, estudos das condições nutricionais e de processo podem incrementar a produção do biossurfactante, induzir a síntese de compostos com melhores propriedades físicas e, ainda, promover a redução dos custos de produção, o que certamente implicará na viabilidade comercial do processo microbiano.

## **2.5 Recuperação da surfactina**

A recuperação do biossurfactante é um fator de grande importância, pois determina a viabilidade do processo industrial. Para muitos produtos biotecnológicos, a etapa de recuperação e purificação pode chegar a mais da metade do total do custo do processo (ISA *et al.*, 2007).

Muitos métodos convencionais são reportados na literatura como: precipitação ácida, extração com solventes, cristalização, precipitação com sulfato de amônio e centrifugação. Recentemente, métodos mais interessantes e menos convencionais têm sido relatados: recuperação da espuma produzida, ultrafiltração, adsorção e desorção em resinas de poliestereno e em carbono ativado, cromatografia de carga iônica e cromatografia líquida de alta resolução (MUKHERJEE, DAS e SEN, 2006). No Quadro 1 estão descritos os procedimentos mencionados para a recuperação, seus princípios e vantagens.

Nem sempre há necessidade de submeter o biossurfactante produzido a processos de purificação. Biossurfactantes purificados são necessários nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, que para tanto, fazem uso de indispensáveis técnicas mais sofisticadas. Podem ser utilizados solventes orgânicos, como por exemplo, acetona, metanol, e clorofórmio, mas devido à toxicidade intrínseca, outras metodologias estão em estudo.

**Quadro 2.1.** Métodos de recuperação de biossurfactante, respectivas propriedades físico-químicas e vantagens

<b>Processo de recuperação</b>	<b>Propriedade responsável pela separação</b>	<b>Vantagens</b>
<b>Precipitação ácida</b>	Biossurfactantes tornam-se insolúveis em baixo de pH.	Baixo custo e eficiente.
<b>Extração com solventes orgânicos</b>	Biossurfactantes são solúveis devido a sua cadeia hidrofóbica	Eficiente, parcial purificação, reutilizável.
<b>Precipitação com sulfato de amônio</b>	Utilizado para biossurfactantes poliméricos	Eficientes no isolamento de certos poliméricos
<b>Centrifugação</b>	Biossurfactantes insolúveis são precipitados devido à força centrípeta	Reutilizável e eficiente
<b>Espuma fracionada</b>	Biossurfactantes na superfície do líquido são coletados através da espuma formada	Alta pureza do bioproduto, recuperação contínua
<b>Ultrafiltração</b>	Biossurfactantes formam micelas (CMC), ficam retidos em uma membrana polimérica;	Rápido, apenas uma etapa de recuperação, alta pureza do produto.
<b>Adsorção em resinas de poliestireno</b>	Biossurfactantes são adsorvidos e depois são removidos por solventes orgânicos	Rápido, apenas uma etapa de recuperação, alta pureza do produto e reutilizável
<b>Adsorção em carvão ativado</b>	Biossurfactantes são adsorvidos e depois são removidos por solventes orgânicos	Alta pureza do produto, reutilizável, barato e recuperação direta do meio de cultura
<b>Cromatografia de troca iônica</b>	Biossurfactantes carregados aderem na coluna e são removidos com tampões.	Alta pureza do produto, reutilizável e baixo custo

Fonte: MUKHERJEE, DAS e SEN, 2006

## 2.6 Aplicações dos biossurfactantes

Esses compostos apresentam propriedades que permitem uma ação específica, diferentemente dos surfactantes sintéticos, por isso é preferivelmente indicado o seu uso em aplicações mais particulares ou nobres (SINGH, VAN HAMME e WARD, 2007). Assim, amplia-se a possibilidade de uso dos compostos tensoativos microbianos, destacando-se as áreas agrícola e médica, bem como setores das indústrias farmacêutica e têxtil (BERTRAND *et al.*, 1994). Essas macromoléculas de origem microbiana também são especiais por causa da capacidade de apresentar o mesmo comportamento quando em ambientes onde os valores de temperatura, pH e salinidade são extremos (KOSARIC, 1996). Na Tabela 2.7 foram compiladas algumas propriedades dos biossurfactantes e possibilidades de aplicação industrial.

**Tabela 2.7.** Possíveis aplicações em diversos setores industriais.

<b>FUNÇÕES</b>	<b>CAMPOS DE APLICAÇÃO</b>
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, alimentos, tintas, óleos, biorremediação
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Umectantes	Produtos farmacêuticos, cosméticos, e têxteis, e em tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, na agricultura
Espumantes	Produtos de higiene, na flotação de minérios
Espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de micelas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Redutores de viscosidade	Transporte de óleo em oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: LIN (1996).

Os biossurfactantes têm sido usados na melhoria do processo de degradação microbiana de óleos e seus derivados em sistemas aquáticos, uma vez que aumentam a interação da água com os hidrocarbonetos. Com este propósito pode-se adicionar nutrientes para estimular a microbiota indígena capaz de produzir biossurfactantes, ou promover a inoculação *in situ* de microrganismos produtores destes compostos. Da mesma forma, a aplicação de biossurfactantes tem demonstrado bom potencial no tratamento de solos contaminados com petróleo e seus derivados (KOSARIC, 1996).

Segundo Kitamoto *et al.* (2002), os biotensoativos que apresentem características, tais como alta atividade emulsificante, dispersante ou de solubilização, podem auxiliar na liberação de contaminantes que estão adsorvidos no solo, favorecendo a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, a sua biodegradação. Estudo realizado por Harvey *et al.* (1990) também mostrou que os ramnolipídios produzidos por linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, favoreceram efetivamente a remoção de óleo adsorvido à cascalho no Alasca, durante o tratamento do ambiente contaminado pelo derramamento de óleo provocado pelo navio Exxon Valdez .

Bognolo (1999) propôs um processo alternativo de limpeza de tanques de armazenamento através da aplicação de biossurfactantes. Estas biomoléculas diminuíram a viscosidade do óleo cru, pela formação de emulsões óleo/água (O/A), o que permitiu o bombeamento do óleo, e a sua recuperação após quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam consigo uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos pouco problemático. A substituição dos surfactantes convencionais pelos biossurfactantes para limpeza de tanques promoveu a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Há muito tempo, os surfactantes vêm sendo cotados para uso na recuperação terciária do petróleo (MEOR), uma tecnologia que faz uso de produtos do metabolismo microbiano produzidos *in situ* ou *ex situ* para a recuperação de óleo residual. No exterior, algumas indústrias petroquímicas já fazem uso de produtos microbianos com este propósito; as primeiras tentativas de introdução de microrganismos em poços datam de 1954 (SHENNAN e LEVI, 1987). Porém, no Brasil, o emprego de bioprodutos ainda não foi efetivo devido ao seu custo ainda elevado. Por exemplo, de acordo com informe técnico da PETROBRAS, o custo da recuperação terciária de óleo com aplicação de surfactante é de 10 a 25 vezes superior em relação ao emprego de polímeros sintéticos.



A MEOR oferece vantagens, uma vez que os métodos convencionais de recuperação de óleo geralmente só permitem a extração de um terço do óleo presente no reservatório (BANAT, 2000). Os microrganismos produtores de surfactantes podem reduzir a tensão superficial do óleo aderido à rocha, favorecendo a movimentação do óleo para os poços de produção. A utilização de biossurfactantes envolve estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de tensoativos no reservatório, e sua subsequente propagação *in situ*, a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento dos microrganismos indígenas produtores de biossurfactantes ou, até mesmo, a injeção do biossurfactante quando produzido *ex situ* (BANAT, 2000).

Desai e Banat (1997) verificaram que a adição de emulsão ao Boscan (um óleo cru pesado venezuelano) resultou em um efetivo decréscimo da sua viscosidade de 200.000 para 100 cP. Após este tratamento foi possível o bombeamento do óleo pesado por 26.000 milhas em um oleoduto comercial. Ressaltando que o mesmo tratamento realizado com surfactante sintético, não apresentou o mesmo resultado.

Os surfactantes microbianos também podem ser úteis na remoção de metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo de ambientes contaminados (NEVES *et al.*, 2004). Ainda podem ser usados na mineração, sendo úteis na flotação, na separação da calcita e eschelita, e na solubilização do carvão. Foi utilizado na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água o “biodispersan”, polissacarídeo produzido por *A. calcoaceticus* A2 (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Alguns biossurfactantes possuem aplicações farmacêuticas como a formação de canais iônicos em membrana; atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e/ou antitumoral, e inibição da formação de coágulos (MULLIGAN, 2005). Por exemplo, o biossurfactante produzido por *Rhodococcus erythropolis* é capaz de inibir os vírus HSV 1 e parainfluenza (NEVES *et al.*, 2004).

Além do mais, devido à sua baixa toxicidade para pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. Os soforoselipídios são utilizados como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. Um processo fermentativo para produção de soforoselipídios foi desenvolvido pela KAO Co. Ltda (Tóquio, Japão); estes compostos, após sofrerem esterificação, resultam em um produto com aplicação hidratante usado na formulação de batons e cremes para pele e cabelos (DESAI e BANAT, 1997). Segundo Desai e Banat (1997) um produto, contendo soforoselipídio, já usado comercialmente como hidratante apresenta excelente compatibilidade com a pele.

Os biossurfactantes também podem ser utilizados no processamento de matérias-primas na indústria de alimentos. A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura do produto alimentício, bem como na dispersão da fase oleosa e na solubilização de aromas. Além disso, os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (BANAT, 2000). Um emulsificante produzido por *Torulopsis utilis* foi utilizado em tempero para saladas (SHEPHORD, 1995).

Na agricultura podem ser usados em formulações de herbicidas e pesticidas, como agentes emulsificantes para dispersar compostos hidrofóbicos em soluções aquosas (LIN, 1996).

Por fim, os biossurfactantes podem ser utilizados nas indústrias têxtil, papel, cerâmica, e tintas (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Por essas várias aplicabilidades citadas, espera-se que daqui a alguns poucos anos o mercado de biossurfactantes detenha 10% do mercado dos surfactantes sintéticos, e que as vendas do bioproduto alcancem o montante de 200 milhões de dólares (HESTER, 2001; MULLIGAN 2005).

## **CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Microrganismo**

Neste estudo foi utilizada uma linhagem de *Bacillus subtilis* previamente isolada de amostra de solo de sistema *Landfarming*, coletada na Refinaria Duque de Caxias (REDUC) da Petrobras. A área é localizada no Distrito Industrial de Campos Elíseos, Município de Duque de Caxias, Estado do Rio de Janeiro.

A identificação da cultura foi feita através de métodos de bioquímica clássica no Laboratório de Fisiologia Bacteriana do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob coordenação do Dr. Leon Rabinovitch.

A cultura recebeu a designação YRE207 e faz parte do acervo do Laboratório de Microbiologia Industrial da Escola de Química da UFRJ.

### **3.2 Manutenção da cultura**

A linhagem bacteriana foi mantida sob refrigeração, a cerca de 4°C, em tubos de ensaio contendo meio agar nutriente (DIFCO 0003) inclinado, através de repiques mensais (cultura estoque).

### **3.3 Meios de cultura**

#### **3.3.1 Meio de inóculo**

A ativação e propagação da linhagem *B. subtilis* YRE207 foi feita em caldo nutriente (DIFCO 0003), acrescido de 5 g/L de glicose. A composição do caldo nutriente é, em g/L: peptona de carne 5,0 e extrato de levedo 3,0.

### 3.3.2 Meio de produção

Para produção do biossurfactante foi utilizado um meio basicamente mineral, constituído em g/L de: NaNO<sub>3</sub> (4,0); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,0); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (6,0); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2). Convencionalmente, esta composição química é usada como base na formulação de meios para produção de biossurfactante por *B. subtilis* (COOPER, 1981; MAKKAR e CAMEOTRA, 1998; REIS, SÉRVULO, DE FRANÇA, 2004)

O meio foi acrescido de 10 g/L de açúcar cristal e 5 mL/L de solução de micronutrientes, cuja composição é apresentada na Tabela 3.1, conforme proposto por Ramana e Karanth (1989). Em alguns experimentos houve também a adição de extrato de lêvedo (0,1 g/L). Após ajuste do pH em 7,0 com solução 0,1 M de NaOH, os meios foram autoclavados a 0,5 atm (110°C) por 15 min. Antes do uso, os meios foram incubados em estufa bacteriológica para teste de esterilidade.

**Tabela 3.1.** Composição da solução de micronutrientes (RAMANA e KARANTH, 1989)

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,116
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,232
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,410
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,008
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,008
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,022
ZnSO <sub>4</sub>	0,174

### 3.4 Preparo do inóculo

A ativação do microrganismo foi feita através do repique da cultura estoque para tubo contendo Agar nutriente inclinado. Após incubação a 30 ± 1°C por 24 h, as células correspondentes a duas alçadas da cultura ativada foram semeadas em 100 mL do meio de inóculo (item 3.3.1) em frascos Erlenmeyers com capacidade para 500 mL. Os cultivos foram incubados a 30 ± 1°C, sob agitação de 150 rpm, em agitador rotatório (Controlled Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co, USA), por

16 h, quando foi determinado o peso seco das células para inoculação dos meios de produção.

### **3.5 PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE**

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 mL, contendo volumes diferenciados de meio dependendo do experimento. Nos ensaios preliminares foi utilizado um volume de 150 mL, enquanto que nos ensaios do planejamento experimental e do estudo cinético, o volume foi de 200 mL a fim de permitir um número maior de amostragens sem comprometer a relação área/volume no decorrer do processo.

A inoculação foi feita com volume adequado de cultivo obtido conforme descrito no item 3.4, de modo a estabelecer concentração inicial de 0,05 – 0,1 g/L em peso seco de células no meio de produção.

Os cultivos foram incubados a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , em agitador rotatório (*Controlled Environmental Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific Co, USA) sob agitação de 150 rpm por 48 h ou 120 h, dependendo do ensaio.

Ao final do processo fermentativo, foram feitas as determinações analíticas que variaram conforme o ensaio. Para todos os experimentos foi feita a determinação da tensão superficial e do pH, em amostras do meio fermentado, previamente centrifugadas a 13.000 g por 20 minutos, para remoção das células. No planejamento experimental ainda foram feitas as quantificações das células viáveis totais e de esporos diretamente no mosto fermentado, e as determinações de substrato final e do índice de emulsificação, no mosto isento de células. Já nos ensaios do estudo cinético foram feitas as determinações quantitativas de células, substrato, tensão superficial, diluição micelar crítica e pH.

Os experimentos foram realizados, no mínimo, em duplicata para garantir a confiabilidade dos resultados; de modo que os valores apresentados representam a média dos resultados com desvio inferior a 10%. Periodicamente, também foi verificada a pureza dos cultivos através de observações microscópicas de preparações coradas pelo método de Gram.

### **3.5.1 Ensaios preliminares**

#### **3.5.1.1 Influência da adição de suplementos ao meio de produção**

Inicialmente, foi feito um estudo comparativo para avaliar a produção de biossurfactante pela linhagem isolada (YRE207) em meio mineral (item 3.3.2) contendo açúcar cristal como fonte de carbono, na presença ou não de suplemento inorgânico (Tabela 3.1) ou orgânico (extrato de lêvedo). Com este propósito, foram conduzidos quatro ensaios constando de:

- Meio mineral + açúcar cristal
- Meio mineral + açúcar cristal + Micronutrientes
- Meio mineral + açúcar cristal + Extrato de lêvedo
- Meio mineral + açúcar cristal + Micronutrientes + Extrato de lêvedo

Neste estudo, as concentrações de extrato de lêvedo e micronutrientes foram respectivamente de 0,1 g/L e 5 mL/L.

Os cultivos foram incubados a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob agitação de 150 rpm por 48 h. Ao final do processo, os cultivos foram avaliados quanto à variação de pH e da tensão superficial. A redução da tensão superficial é uma forma indireta de avaliar a síntese de composto tensoativo por um dado microrganismo em determinadas condições operacionais, mas não permite determinar a quantidade produzida.

#### **3.5.1.2 Influência da fonte de nitrogênio**

Neste estudo, a fonte de nitrogênio inorgânico do meio de produção (item 3.3.2),  $\text{NaNO}_3$ , normalmente usada na formulação de meios para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* (DAVIS, LYNCH e VARLEY, 1999; ANNA *et al.*, 2001; REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004), foi substituído por outras fontes de nitrogênio, algumas das quais comercialmente mais vantajosas. Foram realizados experimentos com as seguintes fontes de nitrogênio: uréia (3 g/L), levedura residual de cervejaria (14 mL/L), sulfato de amônio (6,6 g/L), nitrato de sódio (8,5 g/L) e nitrato de amônio (4 g/L). As concentrações das diferentes fontes de nitrogênio foram calculadas de modo a

se obter a concentração inicial de nitrogênio de 1,4 g/L, valor normalmente usado nos meios de cultura para produção de surfactina (DAVIS, LYNCH e VARLEY, 1999; REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004). Esses experimentos foram realizados utilizando açúcar cristal (10 g/L) como única fonte de carbono e com adição de 5 mL/L de micronutrientes (Tabela 3.1)

Após 48 h de incubação a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob agitação de 150 rpm, foi feita a avaliação da produção do agente tensoativo indiretamente pela determinação da tensão superficial em amostras dos meios fermentados, isentos de células.

### **3.5.2 Efeito da relação carbono/nitrogênio e agitação na produção de biosurfactante**

#### **3.5.2.1 Planejamento experimental duas variáveis e três fatores**

Foi utilizado o planejamento experimental como ferramenta para otimização da relação carbono/nitrogênio e agitação a fim de avaliar a influência destas variáveis na síntese do composto tensoativo por *B. subtilis* YRE207. Para tanto, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo de duas variáveis e três níveis, totalizando nove experimentos. Neste estudo foram avaliadas como variáveis a relação carbono/nitrogênio ( $X_1$ ) e agitação ( $X_2$ ). Foram estabelecidos para o nível superior, representado pelo sinal +1, os valores de 15 g/g e 250 rpm, respectivamente; para o nível inferior os valores respectivos para  $X_1$  e  $X_2$  foram 3 g/g e 50 rpm. Os níveis destas variáveis foram estabelecidos a partir de dados levantados por consulta bibliográfica (REIS, 1998; DAVIS, LYNCH e VARLEY, 1999; 2001).

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando as seguintes equações de codificação:

$$\text{Equação geral: } x_n = [(x - x_0)] / (x_{+1} - x_{-1}) / 2$$

Sendo:  $x$  - o valor da variável a ser calculado;

$x_0$  - o valor da variável no ponto central;

$x_{+1}$  - o valor da variável no nível superior;

$x_{-1}$  - o valor da variável no nível inferior.

As equações finais para as variáveis estudadas sendo representadas como:

$$\text{- Relação carbono/nitrogênio: } X_1 = [C/N - 9] / [(15 - 3)/2] \quad (1)$$

$$\text{- Agitação: } X_2 = [AG(\text{rpm}) - 150(\text{rpm})] / [(250-50)/2] (\text{rpm}) \quad (2)$$

Na Tabela 3.2, é apresentada a matriz do planejamento utilizado.

**Tabela 3.2.** Matriz do Planejamento (Matriz D)

Exp.	Variáveis codificadas		Variáveis Reais	
	C/N	Agitação	C/N	Agitação
1	-1	-1	3	50
2	-1	0	3	150
3	-1	1	3	250
4	0	-1	9	50
5	0	0	9	150
6	0	1	9	250
7	1	-1	15	50
8	1	0	15	150
9	1	1	15	250

O percentual de redução da tensão superficial foi adotado como variável resposta, considerando que este parâmetro é um indicativo da produção de composto tensoativo e, dada à dificuldade em se recuperar o lipopeptídico do meio fermentado, para sua quantificação.

Os resultados dos experimentos foram analisados visando determinar as equações 1 e 2, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), a curva de resíduos, as variáveis significativas, a intensidade do efeito e do ponto estacionário, isto é, se há um ponto de máximo ou de mínimo. A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa *Statistica 5.1* da StatSoft, através da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, tendo como fatores os termos isolados, de interação e quadráticos das variáveis estudadas.

### 3.5.2.2 Planejamento experimental duas variáveis e dois fatores

Considerando que no ensaio anterior foi estabelecida apenas a tendência das variáveis de processo para os níveis limites (C/N 3 e 250 rpm), foi realizado novo planejamento de experimentos a fim de possibilitar a definição destes parâmetros para a



produção de biossurfactante pela linhagem YRE207. Desta feita, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo de duas variáveis e dois níveis, estabelecendo um total de oito experimentos, contabilizadas as réplicas.

As variáveis carbono/nitrogênio ( $X_1$ ) e agitação ( $X_2$ ) foram avaliadas nos níveis superiores, 3 g/g e 300 rpm, e inferiores, 1g/g e 250 rpm, respectivamente. Na Tabela 3.3 estão representadas as variáveis adimensionadas e codificadas, a serem avaliadas pela variação da tensão superficial, como variável resposta.

**Tabela 3.3.** Matriz do Planejamento

Exp.	$X_1$	$X_2$	C/N	Agitação (rpm)
10	-1	-1	1	250
11	-1	+1	1	300
12	+1	-1	3	250
13	+1	+1	3	300

Após a realização dos experimentos, a partir dos dados experimentais foram determinados: a equação do modelo experimental, o  $R^2$ , a curva de resíduos, as variáveis significativas, a intensidade do efeito e a regressão múltipla. Para isto, foi utilizado o programa *Statistica 5.1* da StatSoft.

### **3.5.3 Variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) para as diferentes velocidades de agitação**

O método de sulfito foi utilizado para determinar o  $k_La$ . Este método consiste em transferir oxigênio para uma solução 10 g/L de sulfito de sódio, na presença de um sal de cobre como catalisador. Para tanto, uma solução de 200 mL de sulfito é colocada em frasco Erlenmeyer de 500 mL de capacidade, e em seguida, é feita a adição de 0,2 mL de solução 4% (p/v) de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  dando início a aeração e/ou agitação desejada. Após 15 min, é colhida alíquota de 10 mL e imediatamente nela determinada a concentração de sulfito por iodometria. Com este fim, a amostra é adicionada em uma solução contendo 25 mL de 0,1 N de iodo (em excesso), acrescida de 100 mL de água destilada e 5 mL de 1 M HCl. Desta reação resulta a oxidação do sulfito em sulfato,

donde a determinação é feita indiretamente pela titulação do iodo excedente com tiosulfato de sódio, utilizando goma de amido como indicador (COOPER, FERNSTROM e MILLER, 1944).

Através da estequiometria da reação de oxidação do sulfito a sulfato pelo oxigênio, levando em consideração que todo o oxigênio dissolvido reage instantaneamente, pode-se conhecer a velocidade de dissolução do oxigênio, isto é:

$$[\text{Na}_2\text{SO}_3] = (\text{NI}_2 \cdot \text{VI}_2 - \text{N NA}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{V NA}_2\text{S}_2\text{O}_3) \cdot \text{meq SO}_3^-$$

$$K_{La} = \frac{\Delta \text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 0,127}{\text{CS} \cdot \Delta t}$$

Onde:

- $\text{NI}_2$  = Normalidade do Iodo
- $\text{VI}_2$  = Volume gasto de iodo
- $\text{N NA}_2\text{S}_2\text{O}_3$  = Normalidade do tiosulfato de sódio
- $\text{V NA}_2\text{S}_2\text{O}_3$  = Volume utilizado de tiosulfato de sódio
- $\text{meq SO}_3^-$  = fator estequiométrico
- $\Delta \text{Na}_2\text{SO}_3$  = Variação de sulfito de sódio
- $\text{CS}$  = Constante de saturação
- $\Delta t$  = Variação do tempo

### 3.5.4 Cinética da produção de biosurfactante

Uma vez otimizadas as condições nutricionais (suplementação do meio – relação carbono/nitrogênio) e ambiental (agitação) para a produção do composto tensoativo pela linhagem isolada (YRE207), foi realizada a cinética do processo, utilizando meio de produção suplementado com micronutrientes, na relação carbono/nitrogênio de 3 e agitação de 250 rpm. O processo fermentativo foi mantido a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Em um tempo total de processo de 48 h, foram periodicamente feitas as medidas de concentração de células viáveis e esporos, concentração de sacarose, pH, peso seco, tensão superficial e  $\text{DMC}^{-2}$ .

### **3.5.5 Caracterização parcial do biossurfactante produzido**

A partir da condição de maior percentual de redução de tensão superficial foi feita uma caracterização parcial da molécula produzida pela linhagem *B. subtilis* YRE207, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O perfil cromatográfico foi então comparado ao da surfactina padrão (Sigma-Aldrich) disponível no mercado.

### **3.5.6 Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido**

Após 48 horas de cultivo nas condições estabelecidas (C/N 3 e 250 rpm), o mosto centrifugado foi testado quanto a sua estabilidade em condições adversas de pH e temperatura.

O pH meio foi ajustado para valores 3, 5, 7 e 9 pela adição de HCl (0,1M) ou NaOH (0,1M) e incubados em temperaturas de 10, 30 e 50°C. Nos tempos de 1, 6 e 24 horas foram feitas determinações dos valores de tensão superficial.

## **3.6 Métodos analíticos**

### **3.6.1 Tensão superficial**

A análise da tensão superficial foi usada para determinar qualitativamente a síntese biológica do composto tensoativo. A tensão superficial foi determinada pelo método Du Nouy (COOPER e ZAJIC, 1980) usando tensiômetro SIGMA 70 System Unit (KSV Instruments Ltd). O equipamento é dotado de um anel de platina-iridium com 2,0 cm de diâmetro e 6,4 cm de altura, o qual é imerso no líquido a ser analisado, contido em um recipiente com 5,0 cm de diâmetro. As análises foram realizadas a 25°C e em triplicata.

As medidas foram feitas nos meios, antes e após a fermentação, para cada condição nutricional testada. Para a determinação no meio fermentado, este foi primeiramente centrifugado a 13.000 x g por 20 min a 4°C para remoção das células.

### 3.6.2 Determinação da diluição micelar crítica (DMC)

Alíquotas de 1 mL do mosto fermentado já centrifugado (13.000 g por 15 min a 4°C) foram diluídos 100 em vezes (DMC<sup>-2</sup>) com água destilada, sendo as medidas das tensões superficiais nesta diluição determinadas conforme descrito no item 3.7.1.

### 3.6.3 Índice de emulsificação

A atividade emulsificante foi determinada de acordo com o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). A determinação consistiu em adicionar 6 mL de um dos produtos teste (óleo diesel, querosene de aviação (QAV), óleo árabe leve) à alíquota de 4 mL do meio fermentado centrifugado, em tubo de ensaio (1,8 x 15 cm) com tampa de rosca. Após vigorosa agitação em vortex por 2 min, a emulsão formada foi deixada em repouso por 24 h.

O índice de emulsificação (E<sub>24</sub>) em valor percentual foi calculado dividindo a altura da camada emulsionada pela altura total do líquido e multiplicando por 100, conforme equação abaixo.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EM}}{H_t} \times 100, \quad \text{onde:} \quad \begin{array}{l} H_{EM} = \text{altura da camada emulsionada;} \\ H_t = \text{altura total do líquido.} \end{array}$$

### 3.6.4 pH

As medidas de pH foram realizadas diretamente no meio fermentado isento de células, em potenciômetro digital modelo DMPH-1 (Digimed).

### 3.6.5 Análise cromatográfica

A detecção da surfactina produzida durante o processo fermentativo foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando o Cromatógrafo LC10A – Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa de octadecilsilano (C-18) de 250 x 4,9 mm, no laboratório do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN), sob a coordenação do Prof. Antônio Jorge Ribeiro da Silva.

A fase móvel consistiu de uma mistura das soluções 20% (v/v) de 3,8 mM de ácido trifluoracético (TFA) e 80% (v/v) de acetonitrila. A vazão de eluição foi de  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e a detecção foi feita utilizando-se um detector de absorção no UV a 205 nm (WEI e CHU, 1998). O volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$  de amostra dos meios fermentados previamente tratados, conforme procedimento descrito por WEI e CHU (1998).

O tratamento das amostras previamente centrifugadas (13.000 g/20 min, 4°C) consistiu em submetê-las a ultrafiltração em sistema Amicon, utilizando membranas de 10 kDa. O sistema foi operado a pressão de  $7 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  Pa. Para comparação foi feita também a cromatografia da surfactina purificada comercializada por Sigma-Aldrich (USA).

### **3.6.6 Concentração do substrato**

A sacarose foi quantificada enzimaticamente pelo método enzimático da glicose-oxidase (Glucose Method God Pap-Merck) específico para glicose. Este método colorimétrico é baseado na oxidação da glicose à ácido glucônico e peróxido de hidrogênio.

Antes de realizar a análise, as amostras do meio fermentado previamente centrifugadas (13.000 g/20 min, 4°C) foram submetidas à hidrólise ácida pela adição de HCl 2M, na proporção de 1:1 e aquecidas a 65-67°C, sendo mantidas nesta temperatura por 10 min. Após conveniente diluição da amostra foi feita a análise da glicose conforme procedimento indicado no produto pela empresa.

### **3.6.7 Peso seco**

A concentração celular dos cultivos utilizados para inoculação dos meios de produção, foi determinada por peso seco. A secagem das células microbianas foi feita em forno de microondas da marca LG, modelo MS-114 ML, conforme procedimento descrito por Reis, Sérvulo e de França (2004). Com este fim, alíquotas de 5 mL dos cultivos foram filtradas em membranas Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro, previamente pesadas. Em seguida, as células foram submetidas a três lavagens

consecutivas, cada uma com 5 mL de água destilada. As membranas com as células foram expostas às microondas, na potência máxima (100%) por 2 minutos. Após resfriamento em dessecador, as membranas foram pesadas em balança analítica ao décimo de miligrama. Os valores referentes ao peso seco das células foram calculados pela diferença entre as pesagens das membranas sem e com células, descontado o valor correspondente à perda de peso das membranas devido à ação das microondas.

### **3.6.8 Concentração de células viáveis totais e esporos**

As quantificações de células viáveis e esporos foram feitas pela técnica do plaqueamento *pour plate* em Agar Nutriente (DIFCO 0003). Com este propósito, amostras do meio fermentado, previamente submetidas a diluições decimais sucessivas em solução fisiológica (NaCl 8,5 g/L), foram distribuídas em placas de Petri. Após incubação a 30°C por 48 horas, foram feitas as contagens das colônias, os resultados sendo expressos em unidades formadoras de colônias (ufc)/mL.

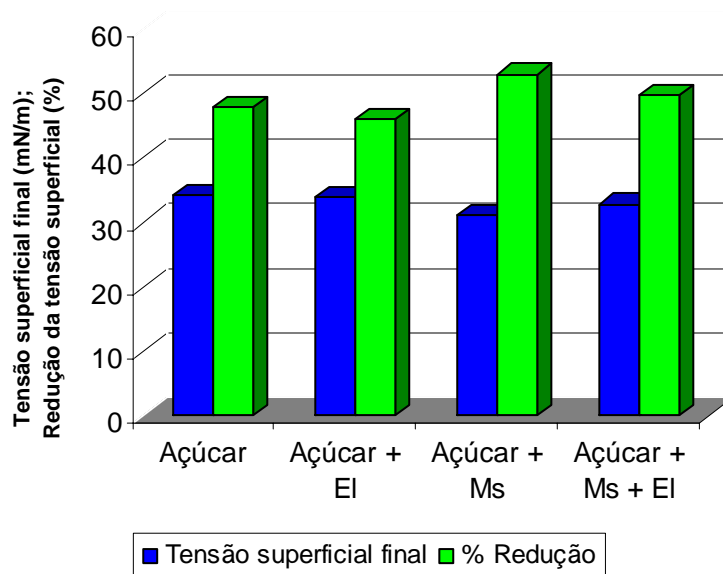
Para a determinação da concentração de esporos, as amostras sofreram prévio aquecimento a 80°C durante 12 min. para inativação das células vegetativas. Após o tratamento térmico, as amostras foram convenientemente diluídas e submetidas ao mesmo procedimento acima descrito para a contagem das células viáveis.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Influência da adição de suplementos ao meio de produção

A Figura 4.1 apresenta os dados referentes à produção de biossurfactante pela linhagem de *Bacillus subtilis* isolada de solo de *Landfarming* (YRE207) a partir de açúcar cristal, com e sem suplementação de composto orgânico (extrato de lêvedo) e/ou inorgânico (micronutrientes – Tabela 3.1). A síntese foi estimada com base na variação da tensão superficial do meio, antes e após 48 e 120 h de processo.

Pode-se observar que nas diferentes condições nutricionais houve uma redução da tensão superficial do meio de 65,2 – 71,4 mN/m, originalmente, para 31,2 – 34,1 mN/m. Segundo Cooper (1986), um organismo é considerado promissor se produz composto tensoativo capaz de reduzir a tensão superficial a valores inferiores a 40 mN/m.



**Figura 4.1.** Variação da tensão superficial dos meios de produção após 48 hs de cultivo da linhagem isolada de *B. subtilis* (AC - Açúcar cristal; EI – extrato de lêvedo; Ms – micronutrientes).

Normalmente, o valor final da tensão superficial é usado como parâmetro para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por um dado microrganismo uma vez que estes compostos quando em solução, devido à presença do grupo hidrofóbico, se situam preferencialmente na superfície do líquido, diminuindo a força de coesão entre as moléculas do fluido e, conseqüentemente, ocasionando a redução deste parâmetro

(BEHRING *et al.*, 2004). Logo, a redução da tensão superficial de um meio após fermentação é um indício de que houve síntese de composto tensoativo e, quanto maior o decréscimo, tanto maior foi a quantidade produzida. Entretanto, conforme abordado no Capítulo 2, a análise da tensão superficial só pode ser usada como parâmetro de avaliação do potencial de um dado microrganismo em produzir biossurfactante, não sendo possível a sua estimativa em termos quantitativos. Isto porque, após saturação da superfície pelo tensoativo, a adição de novas moléculas não mais interfere sobre o valor da tensão superficial, o que se verifica quando é alcançada a concentração micelar crítica (CMC).

Com base no exposto, pode-se inferir que a linhagem YRE207 é potencialmente capaz de sintetizar composto tensoativo quando cultivada em meio básico contendo uma fonte de carbono renovável e de baixo custo, o que corrobora trabalhos anteriormente publicados. Na literatura, é relatado que a bactéria *B. subtilis* é capaz de produzir moléculas tensoativas a partir de diversas fontes de carbono, tanto solúveis (COOPER *et al.*, 1981; MAKKAR e CAMEOTRA, 1997; REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004) quanto insolúveis (ATLAS, 1981; ZOSIM *et al.*, 1982; TIEHM, 1993).

De fato, a fonte de carbono tem papel fundamental na produção do biossurfactante posto que influencia tanto o rendimento quanto o custo do processo, bem como a estrutura molecular da biomolécula a ser produzida e, portanto, as suas propriedades físico-químicas (KITAMOTO *et al.*, 1992; FIETCHER, 1992; GEORGIU *et al.*, 1992; ADAMCZAK e BEDNARSKI, 2000). De acordo com Mukherjee, Das e Sen (2006), a matéria-prima representa 10-30% do custo total da produção para a maioria dos processos biotecnológicos.

Deve também ser considerado se a matéria-prima é rapidamente consumida pelo microrganismo, gerando o máximo de produto em curto prazo. Neste trabalho, a redução da tensão superficial já foi satisfatória com 48 h de processo; os melhores valores de tensão superficial (31,2 mN/m) e percentual de redução da tensão superficial (53%) foram obtidos quando a bactéria foi cultivada em meio mineral contendo açúcar cristal e micronutrientes (Figura 4.1). Resultados semelhantes foram obtidos por Reis, Sérvulo e De França (2004) para o cultivo da linhagem *B. subtilis* ATCC 6633 em açúcar cristal por 48 h.

Makkar e Cameotra (1997) estudaram a produção de lipopeptídios por *B. subtilis* MTCC termofílico em diferentes fontes de carbono. Os menores valores de tensão



superficial foram de 28, 29 a 30 mN/m e foram obtidos com a adição glicose, sacarose e extrato de carne, respectivamente.

Analisando a Figura 4.1, verifica-se que a adição de sais minerais ao açúcar cristal apresentou um aumento na produção do composto tensoativo, acarretando um ligeiro aumento no percentual de redução da tensão superficial. Na literatura, está reportado que alguns metais intensificam a produção da surfactina (COOPER e GOLDENBERG, 1987; BANAT, 1993). Mais recentemente, Wei e Chu (2002) determinaram que adição de  $Mn^{+2}$ , na concentração de 0,01mM, foi a mais indicada para intensificar a produção da surfactina. Segundo esses autores, este elemento traço está envolvido com a assimilação de nitrogênio. Assim, os resultados obtidos na pesquisa desenvolvida corroboram os resultados apresentados por Cooper e Goldenberg (1987), Banat (1993) e por Wei e Chu (2002).

A adição de extrato de lêvedo no meio causou a redução do valor inicial da tensão superficial, como consequência da presença de *debris* celulares. Resultados semelhantes foram obtidos por Reis, Servulo e de França (2004) em cultivos de *B. subtilis*. Adicionalmente, verificou-se que o extrato de lêvedo não influenciou a produção do biosurfactante, apesar do conteúdo de em vitaminas e sais minerais desse nutriente.

A adição de extrato de lêvedo e, em especial, de micronutrientes ao meio atenuou o abaixamento do pH (Tabela 4.1). É interessante notar que estudo realizado com a linhagem ATCC 6633, em meio de composição similar, apresentou elevação do pH, atingindo valores de  $8,3 \pm 1,0$  (REIS, SERVULO e DE FRANÇA, 2004). Com base nos resultados obtidos foi selecionado o meio suplementado com micronutrientes para a continuidade deste trabalho.

**Tabela 4.1.** Valores de pH nos diferentes meios após cultivo de *Bacillus subtilis* YRE

207	<b>Meios de produção</b>	<b>pH final</b>
	Açúcar cristal	5,50
	Açúcar cristal + El	6,00
	Açúcar cristal + Ms	6,50
	Açúcar cristal + Ms + El	6,50

El – extrato de lêvedo (0,1 g/L); Ms – microutrientes

## 4.2 Influência da fonte de nitrogênio

A fim de intensificar a produção do biossurfactante foi realizado estudo variando a fonte de nitrogênio. A Tabela 4.2 apresenta os valores de tensão superficial e pH nos meios fermentados para as diferentes fontes de nitrogênio, orgânicas (levedura residual de cervejaria e uréia) e inorgânicas (nitrato de sódio, nitrato de amônio e sulfato de amônio).

É patente a variação do percentual de redução da tensão superficial em função da fonte de nitrogênio utilizada. O nitrato de sódio e, em especial, a levedura residual de cervejaria não foram capazes de reduzir significativamente a tensão superficial do meio de cultura.

**Tabela 4.2.** Influência da fonte de nitrogênio na tensão superficial e pH em cultivos de linhagem isolada de *Bacillus subtilis*

Fonte de Nitrogênio	Tensão superficial (mN/m)		pH
	Final	(%)	Final
Nitrato de amônio	31,5	53	7
Uréia	37,3	40	6
Levedura residual de cervejaria	40,3	13	6,5
Sulfato de amônio	40,2	37	6
Nitrato de sódio	54,4	12	7

Condições iniciais do processo: Açúcar cristal = 10 g/L; Nitrogênio = 1,4 g/L; Concentração celular inicial = 0,1 g/L; T = 30°C; pH<sub>inicial</sub> = 7,0 ; tempo = 48 h; agitação = 150 rpm.

No período final de crescimento, as células cultivadas em nitrato de sódio apresentaram morfologia muito distinta das observadas nas demais condições nutricionais estudadas; a presença de “grumos” no meio de cultivo era visível à olho nu. A formação de aglomerados celulares pode ser um diferencial, já que poderia favorecer a separação das células do meio ao término do processo fermentativo.

Os meios de produção contendo como fonte de nitrogênio uréia ou nitrato de amônio foram os que mais estimularam a produção do composto tensoativo, resultando

em percentuais de redução da tensão superficial de 40% e 53%, respectivamente. Portanto, pode-se indicar o nitrato de amônio como a fonte de nitrogênio mais favorável à síntese do bioproduto pela linhagem YRE207, devido ao maior valor de porcentagem de redução da tensão superficial encontrado entre as fontes estudadas.

É muito reduzido o número de publicações sobre a influência qualitativa e/ou quantitativa da fonte de nitrogênio na síntese do composto tensoativo por *B. subtilis*.

Davis, Linch e Varley (1999) mostraram que o tipo e a concentração da fonte de nitrogênio são importantes para a otimização da produção de metabólitos secundários, como é o caso da maioria dos biossurfactantes. Segundo esses autores, o emprego de íon amônio como fonte de nitrogênio favoreceu o crescimento celular de *B. subtilis* ATCC 21332, enquanto o íon nitrato foi consumido durante seu metabolismo secundário, ou seja, para a síntese de biossurfactante.

Makkar e Cameotra (1997) obtiveram o máximo de produção de lipopeptídeo a partir de uma linhagem de *Bacillus subtilis*, após cultivo a 45°C por 72 h, com uréia ou íon nitrato, na concentração de 3 g/L.

Um estudo feito com diferentes fontes de nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), em concentrações variando entre 2 e 5 g/L, revelou que somente na presença de 2 ou 3 g/L de  $\text{NaNO}_3$  foi obtida redução satisfatória da tensão superficial do meio onde foi cultivada linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* (ROBERT *et al.*, 1991). Similarmente, estudo realizado por Anna *et al.* (2002) com *Pseudomonas aeruginosa* revelou ser o nitrato de sódio mais adequado do que a uréia e o sulfato de amônio para produção de biossurfactante. Mais recentemente, Fernandes *et al.* (2005) também obtiveram maior quantidade de ramnolipídeos (7,3 g/L) com 4 g/L de  $\text{NaNO}_3$ , com 72 h de processo.

Banat (1993) reforçou a tese anteriormente levantada por Cooper e Goldenberg (1987) de que o rendimento de surfactina pode ser aumentado pela adição de alguns metais como, por exemplo, ferro e manganês. Um estudo posterior comprovou que a adição de ferro em meio de cultura contendo glicose concorre para melhorar a produção de lipopeptídeo (WEI e CHU, 1998). Mais recentemente, esses mesmos autores determinaram que adição de  $\text{Mn}^{+2}$ , na concentração de 0,01 mM, também intensifica a produção de surfactina que, de acordo com eles, favorece a assimilação de nitrogênio (WEI e CHU, 2002).

Amézcu-Vega *et al.* (2007) investigaram o efeito das relações C/P, C/N inorgânico, C/Fe e C/Mg na produção de biossurfactante pela levedura *Candida ingens*. A produção do composto tensoativo aumentou 3,42 vezes quando foram estabelecidas relações C/P e C/Fe de 30 e 780, respectivamente.

Contudo, o emprego de levedura residual cervejeira como fonte de nitrogênio para a linhagem YRE207 não teve o efeito esperado. Esta fonte apresenta alto valor nutricional, representado pelo seu conteúdo protéico, de fatores de crescimento (aminoácidos, purinas e pirimidinas), de vitaminas, sobretudo do complexo B, e de sais minerais (PELCZAR, 1993). Possivelmente, o uso de um meio rico tenha favorecido o crescimento em detrimento da produção do composto tensoativo, ou tenha retardado a sua síntese, no caso de ser ele um produto do metabolismo secundário.

Estes resultados mostram que os constituintes do meio apresentam um papel fundamental na produção de surfactantes, dependente do microrganismo e, principalmente, da linhagem produtora. Trabalhos anteriores já demonstraram como a fonte de nitrogênio e suas interações influenciam o rendimento e o custo do processo, bem como podem alterar a estrutura molecular do bioproduto e, conseqüentemente suas propriedades físico-químicas (FIETCHER, 1992; GEORGIU *et al.*, 1992; KITAMOTO *et al.*, 1992).

Os valores de pH obtidos ao fim das fermentações se situaram entre a neutralidade e ligeiramente ácida. Segundo Claus e Berkerley (1984), o pH ideal para o crescimento de *Bacillus subtilis* se situa na faixa de 5,5 a 8,5. E, conforme relato de Makkar e Cameotra (1997), só ocorre decréscimo substancial da quantidade produzida de biossurfactante por linhagem de *B. subtilis* quando o pH do meio é ajustado em 4,5. Logo, pode-se inferir que não houve variação de pH que pudesse influenciar negativamente no metabolismo da linhagem YRE207, com vistas à produção de biossurfactante; o que por sua vez reflete em não haver ônus com controle de pH ao longo do processo.

Porém, De Roubin *et al.* (1989) observaram que um aumento no valor de pH, de 6,7 para 8,0, no meio de produção, resultou na diminuição da síntese de surfactina por *B. subtilis*.

Wei e Chu (1998) verificaram que a adição de 2 a 4 mM de ferro controlando o pH em 5, conduziu a uma produção da surfactina de 3 g/L. Segundo estes autores, uma alta concentração de ferro acarreta uma via metabólica acidogênica. Mas, em outro

trabalho, também realizado com *B. subtilis*, foram obtidos valores máximos e constantes de biomassa e de biossurfactante na faixa de pH de 6,5 a 10,5 (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997).

A estabilidade da molécula de surfactina foi estudada em diferentes valores de pH, e notou-se que a redução do pH a valores abaixo de 5,0 causa a precipitação do surfactante microbiano e, portanto, a elevação da tensão superficial do mosto (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

### **4.3 Efeito da relação carbono/nitrogênio e agitação na produção de biossurfactante**

Estes ensaios tiveram como proposta principal otimizar alguns parâmetros envolvidos na síntese de biossurfactante por linhagem isolada visto que, como já extensivamente enfatizado, as condições de processo alteram a qualidade e a quantidade dos biossurfactantes (DESAI e BANAT, 1997). Esta estratégia de estudo também visou maximizar a formação do bioproduto, buscando obter um custo competitivo quando comparado aos surfactantes comercializados. Dessa forma, foi realizada a avaliação da relação carbono/nitrogênio e da agitação na produção de biossurfactante, com uso de ferramentas estatísticas e de planejamento experimental. Empregou-se um desenho de experimentos com as duas variáveis citadas, em três níveis. Utilizou-se como variável resposta a redução da tensão superficial (Tabela 4.3).

Os resultados de tensão superficial determinados para diferentes relações C/N [3 (1, 2, 3), 9 (4, 5, 6) e 15 (7, 8, 9)] e valores de agitação [50 (1, 4, 7), 150 (2, 5, 8) e 250 (3, 6, 9) rpm] estão representadas na Tabela 4.3. Nas relações C/N 3 e 9, a redução da tensão superficial foi diretamente proporcional ao aumento da agitação. No entanto, para a relação de 15 foi constatado um comportamento distinto, uma vez que os valores da tensão superficial aumentaram com a elevação do nível de agitação. A análise destes resultados indica os níveis de máximo para a agitação e de mínimo para C/N como os mais favoráveis para a produção de biossurfactante pela linhagem YRE207 em meio mineral contendo açúcar cristal e nitrato de amônio, como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Em geral, os trabalhos publicados na literatura adotam uma relação carbono/nitrogênio em torno de 3 e agitação de 150 rpm. No entanto, Davis, Lynch e Varley (1999) obtiveram a maior concentração de surfactina (439 mg/L) pelo cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em meio contendo 10 g/L de glicose e 4 g/L de nitrato de amônio, o que representa uma relação C/N de 11.

Um estudo sobre o efeito da fonte de carbono na produção de ramnolipídios foi desenvolvido por Anna *et al.* (2002) empregando linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse estudo, os autores relataram que a relação C/N de 60, para glicerol e nitrato de sódio, foi a mais adequada para o processo fermentativo. Singer e Finnerty (1990) estudaram o efeito da relação C/N na produção de glicolípídeos por cultivo de *Rhodococcus* sp. H13-A usando hexadecano. Esses autores relataram que com um pequeno aumento da relação C/N (hexadecano/nitrato de sódio) de 1,7 para 3,4 havia melhorado a biossíntese dos tensoativos. As diferenças entre os resultados alcançados no presente trabalho de pesquisa e aqueles apresentados por ANNA *et al.* (2002) e por Singer e Finnerty (1990) estão relacionadas aos efeitos das fontes de carbono, dos nutrientes e das linhagens microbianas empregadas. Esses resultados corroboram as alegações de Desai e Banat (1997), de Mulligan (2005) e de Wei, Lai e Chang (2006) sobre a influência de variáveis de processo e das condições nutricionais na biossíntese de surfactantes microbianos.

**Tabela 4.3.** Valores médios de tensão superficial determinados nos meios fermentados em diferentes condições experimentais

Exp.	C/N	Agitação (rpm)	Redução da Tensão Superficial (%)
1	3	50	38,3
2	3	150	39,5
3	3	250	45,9
4	9	50	29,3
5	9	150	34,8
6	9	250	36,2
7	15	50	36,7
8	15	150	35,1
9	15	250	32,5

Condições do processo: Açúcar cristal = 10 g/L; Concentração celular inicial = 0,05 g/L; T = 30°C; pH<sub>inicial</sub> = 7,0 ; tempo = 48 h.

Além da tensão superficial, foram feitas outras determinações quantitativas nos mostos fermentados nas nove diferentes condições experimentais (Figuras 4.2 a 4.4). Na

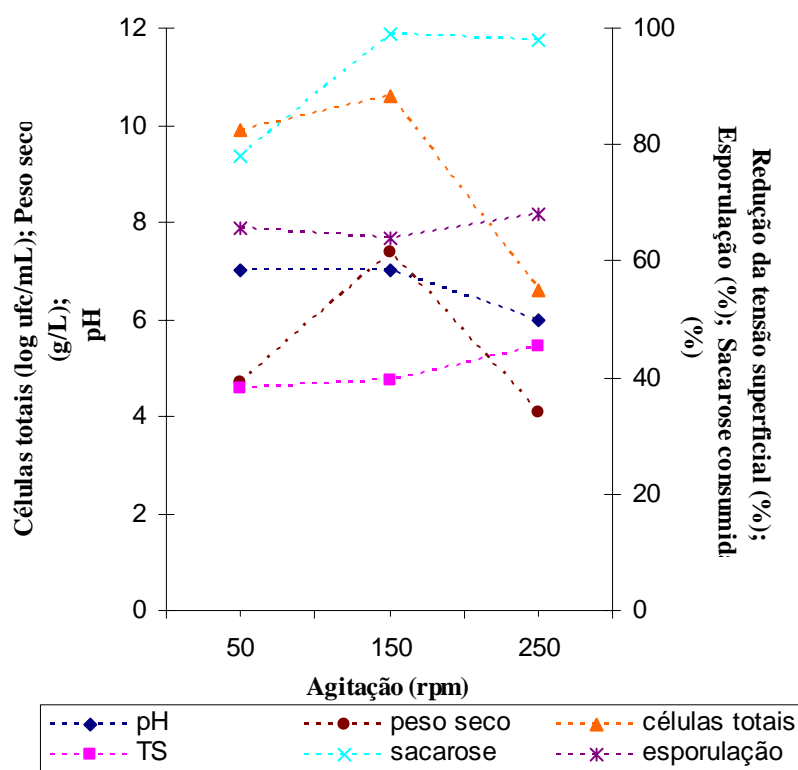
Figura 4.2, podem ser observadas as variações dos diferentes parâmetros analisados para a relação C/N=3, para os três valores de agitação estudados (50, 150 e 250 rpm). A concentração de células totais viáveis se manteve praticamente inalterada nas agitações de 50 e 150 rpm, porém o aumento da agitação para 250 rpm reduziu a atividade metabólica da linhagem bacteriana.

De forma geral, o aumento da agitação permite homogeneização de meios líquidos e, por conseguinte, a maior transferência de massa, por exemplo, de nutrientes e oxigênio. O aumento da disponibilidade de oxigênio no meio pode acelerar o crescimento dos microrganismos aeróbicos, com a conseqüente redução do tempo da fase exponencial de crescimento. Isto ocorre enquanto a concentração de oxigênio dissolvido é igual ou inferior à demandada pelo microrganismo. Entretanto, a partir de uma dada concentração de oxigênio dissolvido pode ocorrer inibição do crescimento e/ou da síntese do biossurfactante. O oxigênio permeia facilmente pela membrana celular e, dado o alto poder redutor das células metabolicamente ativas, pode haver a formação de peróxidos e superóxidos que, se em grande quantidade, não são totalmente clivados pelas enzimas específicas (catalase, superóxidodismutase), o que vai causar lesões intracelulares e, por fim, a morte da célula. Assim, é importante aerar o meio de modo a favorecer as reações de biossíntese, que são dependentes de energia, resultando em maior quantidade de células formadas e, portanto, com maior probabilidade de formação de esporos. Mas há que se definir adequadamente a disponibilidade de oxigênio para não interferir na inibição do processo e na elevação dos custos de produção.

A análise das figuras citadas acima demonstra que a esporogênese pouco variou em função da velocidade de agitação. A variação do peso seco está em conformidade com os resultados de concentração celular e percentual de esporulação, visto que as células vegetativas apresentam peso maior do que as formas esporuladas. O consumo de substrato de 78% na agitação de 50 rpm aumentou para em torno de 99% quando os cultivos foram mantidos sob agitação de 150 ou 250 rpm. Resultados semelhantes foram obtidos por Nitschke e Pastore (2006) na fermentação de meio contendo manipueira; o esgotamento total do conteúdo de sacarose também ocorreu decorridas 48 h. Nesta condição, houve um comportamento análogo do percentual de redução da tensão superficial com o de esporulação, o que sugere que a síntese do composto tensoativo é estimulada ao final da fase exponencial de crescimento, isto é, quando ocorre a formação de esporos. De acordo com Branda *et al.* (2001), a produção da surfactina está

relacionada com o processo de esporulação do *B. subtilis* já que, como mencionado por eles, a formação de esporos é dela dependente.

O valor do pH permaneceu praticamente inalterado nas agitações mais baixas (50 e 150 rpm), embora na agitação de 250 rpm tenha provocado a acidificação do meio após fermentação. Wei e Chu (1998) também observaram a existência de uma via metabólica acidogênica quando o meio continha ferro.



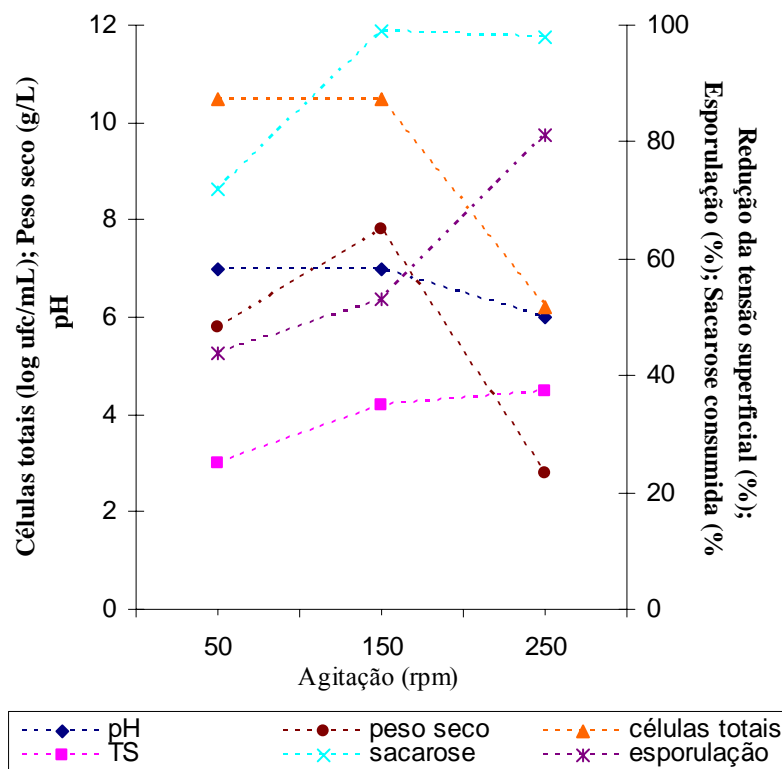
**Figura 4.2.** Resultados obtidos para a condição C/N = 3 em função da agitação.

Na relação C/N de 9 foram observados perfis semelhantes para os parâmetros analisados em comparação à relação C/N 3 (Figura 4.3), exceto para os percentuais de tensão superficial e esporulação, quando foram notados aumentos crescentes. Entretanto, desempenho distinto foi evidenciado pelo cultivo da bactéria em meios com

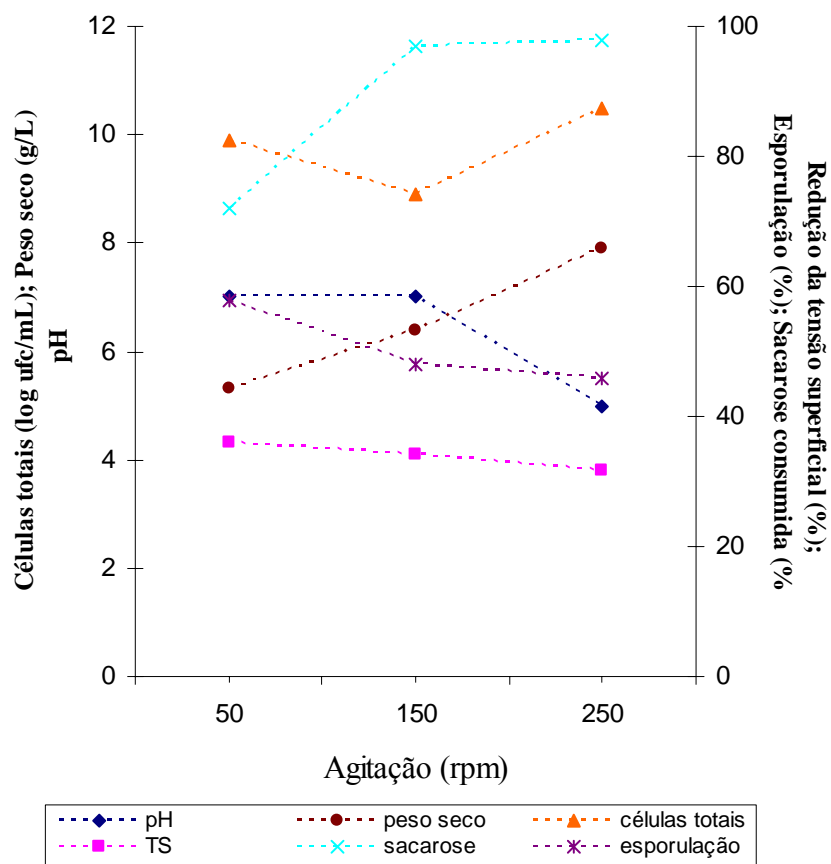


relação C/N = 15, exceto pelo consumo de substrato e variação do pH que apresentaram os mesmos perfis nas três relações C/N ensaiadas (Figura 4.4).

Nesta condição, o aumento da agitação, promoveu um aumento crescente da concentração de células em peso seco, inclusive a 250 rpm; provavelmente devido à maior disponibilidade de oxigênio dissolvido. Contudo, foi observado um ligeiro declínio dos percentuais de esporulação e de redução da tensão superficial com o aumento do valor da agitação.



**Figura 4.3.** Resultados obtidos para a condição C/N = 9 em função da agitação.



**FIGURA 4.4.** valores obtidos para C/N=15 sob diferentes velocidades de agitação.

Wei, Chou e Chang. (2005) pesquisaram o efeito de diferentes velocidades de agitação, de 50 a 250 rpm, na produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* J4. A linhagem microbiana em questão havia sido isolada de água residuais de industria petroquímica. Os autores reportaram que a agitação de 200 rpm foi a mais favorável aumentando em cerca de 80% a produção dos ramnolipídeos.

No trabalho de pesquisa aqui desenvolvido, as amostras dos cultivos obtidos nas diferentes condições estabelecidas no planejamento experimental foram também avaliadas quanto à atividade emulsificante. Note-se que todas as amostras foram capazes de emulsionar Petróleo árabe leve, com índices de 100%. Nossos resultados demonstram uma possibilidade de emprego do composto produzido no tratamento microbiano de solos e aquíferos contaminados com petróleo e na limpeza de tanques de

estocagem. No entanto, os testes realizados com querosene de aviação, gasolina e óleo diesel não levaram a formação de emulsão com a fase aquosa. Considerando os dados obtidos não se achou conveniente apresentá-los em gráfico ou tabela.

A análise das Figuras 4.2 a 4.4 permite definir que para obter a máxima produção de biossurfactante pela linhagem YRE207 a partir de açúcar cristal e nitrato de amônio deve-se utilizar a relação C/N de 3 e manter o meio agitado durante o processo fermentativo na velocidade de 250 rpm. Como estes pontos foram os de mínimo e máximo, foi realizado novo planejamento experimental de modo a avaliar se em valores menores de C/N e maiores de velocidade de agitação poder-se-ia alcançar maior quantidade do bioproduto.

Assim sendo, foram realizados experimentos nas condições de C/N de 1 e 3 e nas velocidades de agitação de 250 e 300 rpm, analisando como variável resposta a variação da tensão superficial. Os resultados obtidos para um planejamento experimental de duas variáveis e dois níveis estão apresentados na Tabela 4.4.

Analisando os resultados referentes aos experimentos 10 e 11, pode-se determinar que o aumento da agitação de 250 para 300 rpm, não alterou significativamente o valor da tensão superficial. No entanto, ao se comparar os valores de tensão superficial, obtidos nos experimentos 12 e 13, pode-se verificar que o aumento da agitação teve um efeito negativo na produção do composto tensoativo. Tem-se ainda que, de um modo geral, não houve diferenciação nos valores de consumo de substrato, síntese de material celular e percentual de esporulação. Exceto por uma pequena variação de tensão superficial e no pH.

De acordo com os dados apresentados, a maior produção de biossurfactante, indiretamente determinada pela redução da tensão superficial, corresponde às condições: C/N 3 e velocidade de agitação 250 rpm

**Tabela 4.4.** Valores de tensão superficial em diferentes condições experimentais

Exp	Relação C/N	Agitação (rpm)	Tensão superficial Final (mN/m)	Redução da Tensão superficial (%)	pH	Peso seco (g/L)	Percentual de sacarose consumida (%)	Percentual de Esporulação (%)
10	1	250	40,7	38,3	6,5	4,0	96	70
11	1	300	39,9	41,6	6,3	3,8	95	70
12	3	250	35,1	47,2	7,0	3,4	97	68
13	3	300	38,6	41,6	6,7	3,6	96	68

Açúcar cristal = 10 g/L; Concentração inicial celular = 0,05 g/L; T = 30°C; pHinicial = 7,0 ; tempo = 48 h.

## 4.4 Análise estatística

### 4.4.1 Planejamento experimental duas variáveis e três fatores

Nesta etapa foi realizada a otimização das variáveis: relação carbono/nitrogênio (C/N) e nível de agitação (AG), considerando como variável resposta o percentual de redução da tensão superficial. Assim, a partir dos resultados obtidos (Tabela 4.3), efetuou-se uma regressão múltipla, tendo como fatores, os termos isolados, as interações e os quadráticos das duas variáveis estudadas.

A Tabela 4.3 apresenta os percentuais de redução da tensão superficial dos meios, antes e após fermentação, para cada experimento.

Esses dados, após regressão múltipla no programa *Statistica* 5.1, permitiram obter a seguinte equação para modelar o comportamento da variável resposta:

$$\text{Redução da tensão superficial (\%)} = 33,4222 - 3,2333X_1 + 1,7166X_2 + 4,5666X_1^2 + 0,0166X_2^2 - 2,951X_1X_2 \quad (4.1)$$

A Tabela 4.5 apresenta os resultados obtidos para a regressão múltipla da redução da tensão superficial.

**Tabela 4.5.** Resultados da regressão múltipla para redução da tensão superficial

Fatores	Paramêntros	Nível de significância
Constante ( $\beta^0$ )	33,4333	0,00003
$X_1$ (C/N)	- 3,2333	0,029094
$X_1^2$ (C/N <sup>2</sup> )	4,5666	0,056499
$X_1X_2$ (C/NAG)	- 2,9500	0,073636
$R^2 = 0,803$	$F_C = 6,7918$	$F_T (1,6) = 3,78$

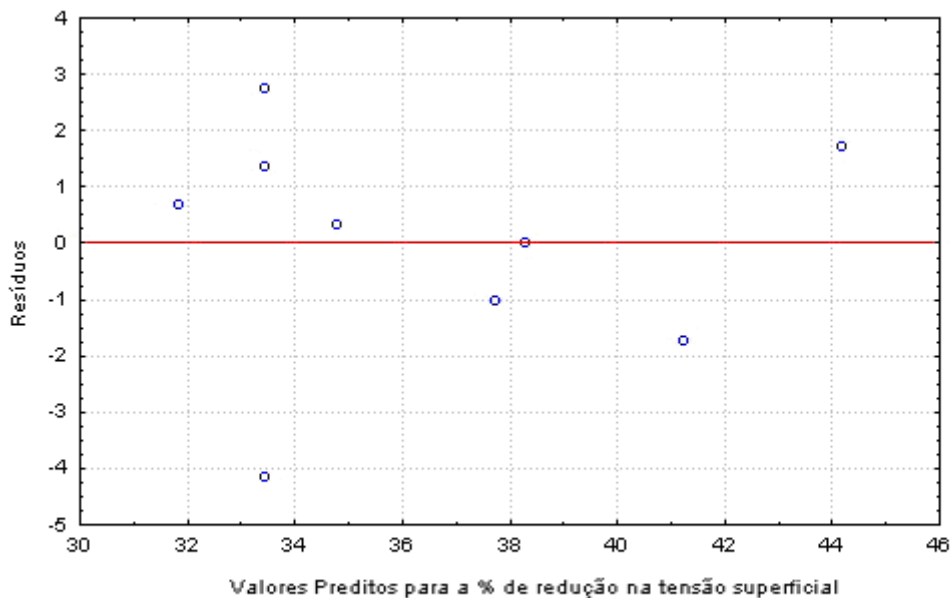
Na regressão usada foram eliminados os parâmetros com nível de significância do teste t de *Student* superiores a 10%, sendo as variáveis relacionadas a estes consideradas não relevantes. Assim, foram desprezados os termos isolados da agitação ( $X_2$ ) e do termo quadrático da agitação ( $X_2^2$ ).

Nota-se que as variáveis que influenciam na redução da tensão superficial. Analisando os dados apresentados nesta tabela verifica-se que a relação C/N foi a única variável isolada significativa na percentual de redução da tensão superficial.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,803 indica um ajuste adequado dos dados experimentais na resposta percentual de redução da tensão superficial, mostrando que 80,3% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

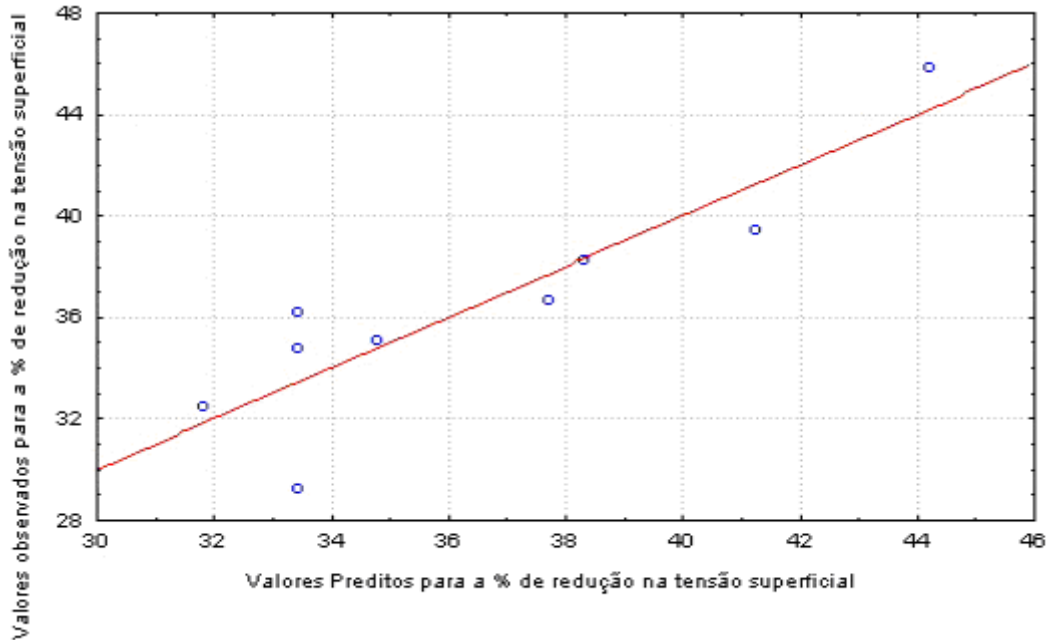
O resultado de F calculado ( $F_c$ ) foi superior ao F tabelado ( $F_T$ ) para um nível de significância de 1%. Esta comparação pode ser interpretada através de um teste de hipótese. A hipótese de nulidade ( $H_0$ ) diz que o modelo não é significativo, ou seja, todos os parâmetros são iguais a zero. A hipótese alternativa ( $H_1$ ) afirma que o modelo é significativo. O resultado do teste F mostrou que se pode rejeitar  $H_0$  no nível de significância de 1%, ou seja, tem-se uma confiança de 99% de que o modelo é significativo. Esta análise foi extrapolada para as demais respostas obtidas neste planejamento experimental.

A Figura 4.5 mostra a distribuição dos resíduos em torno do zero, enquanto na Figura 4.6, pode ser observada a representação dos valores preditos versus observados.



**Figura 4.5.** Distribuição dos resíduos relativa ao percentual da redução da tensão superficial.

A Figura 4.5 mostra que a distribuição dos resíduos apresenta comportamento aleatório em torno do zero, não apresentando nenhuma tendência quanto à distribuição.



**Figura 4.6.** Valores preditos em função dos observados relativos ao percentual da redução da tensão superficial.

Na Figura 4.6, nota-se que as respostas experimentais para a redução da tensão superficial apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela equação empírica.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, conforme apresentado na Tabela 4.6, obteve-se a seguinte equação:

$$\text{Redução da tensão superficial (\%)} = 33,4333 - 3,2333X_1 + 4,5666X_1^2 - 2,95X_1X_2 \quad (4.2)$$

Analisando esta equação, pode-se observar pelo sinal negativo da variável  $X_1$  que os menores valores na relação C/N proporcionam maiores valores no percentual de redução da tensão superficial. Este fato pode ser confirmado pela comparação dos resultados obtidos nos experimentos 1, 2 e 3 em relação aos demais ensaios (Tabela 4.3).

A partir da equação completa (Eq. 4.1) foi feita a implementação de um algoritmo no programa *Maple V release 4* para calcular o ponto estacionário. O cálculo deste ponto levou aos seguintes valores:  $X_1 = 0,590186$  e  $X_2 = 0,731199$ . As coordenadas do ponto estacionário estão dentro da região experimental. Os valores dos Xs referentes à redução na tensão superficial indicaram que esta resposta possui um ponto de sela, pois nos pontos onde as variáveis  $X_1$  e  $X_2$  assumem os valores de  $-0,419649$  e  $5,002989$ , respectivamente, a primeira e a segunda derivada da equação de estimação do valor de redução da tensão superficial (Eq. 4.2.) apresentam valores positivos para o conjunto imagem.

Ainda através do mesmo algoritmo implementado no programa *Maple V release 4*, foram calculados valores das variáveis codificadas (X's) correspondentes à maximização da resposta, obtendo os seguintes valores das variáveis codificadas no ponto de maximização da resposta:  $X_1 = -1,0$  e  $X_2 = 0,98$ .

Utilizando as equações de codificação:

Relação carbono/nitrogênio:  $X_1 = [C/N - 9] / [(15 - 3)/2]$

Agitação:  $X_2 = [AG \text{ (rpm)} - 150(\text{rpm})] / [(250 \text{ rpm} - 50 \text{ rpm}) / 2]$ , obtêm-se que os valores reais das concentrações das variáveis no ponto de maximização da redução da tensão superficial:

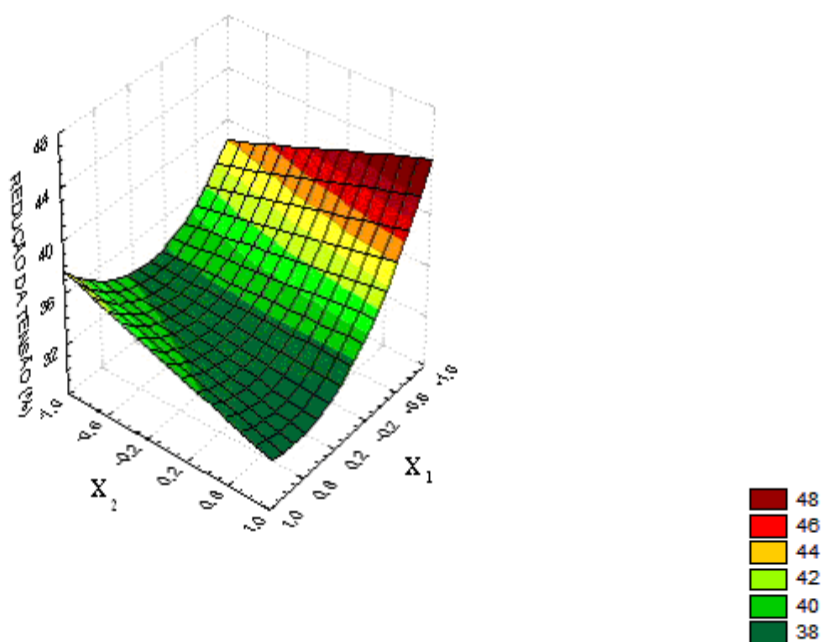
$X_1 = 3,0$  para a relação C/N;

$X_2 = 248 \text{ rpm}$  para a agitação.

A partir dos valores codificados das variáveis  $X_1$  e  $X_2$  no ponto de máximo, determinou-se que o percentual de redução da tensão superficial neste ponto foi de 44,2%. Comparando este valor ao da percentagem de redução no experimento 3 (Tabela 4.3), quando foi obtida a maior redução da tensão superficial (45,9%), verifica-se a similaridade dos resultados. Isto era previsto, já que os valores, correspondentes às concentrações das variáveis do processo no ponto de otimização, estão próximos àqueles do experimento 3. O menor valor de percentual de redução da tensão superficial obtido pelo modelo foi devido ao coeficiente de correlação, indicativo de apenas 80,3% foram representados pelo modelo.

Como forma para ilustrar os efeitos das variáveis estudadas na redução da tensão superficial está apresentado na Figura 4.7 a superfície de resposta relacionando as variáveis duas a duas com a resposta.





**Figura 4.7.** Superfície de resposta para o percentual de redução da tensão superficial em função da relação C/N e do nível de agitação ( $x_1$ - variável relação C/N codificada;  $x_2$ - variável agitação codificada).

A Figura 4.7 mostra que para menores valores da relação C/N, maiores níveis de agitação proporcionam maiores valores no percentual de redução da tensão superficial. Por outro lado, para valores menores de C/N ocorre um ponto de mínimo no percentual de redução da tensão superficial para maiores valores de agitação. Como já mencionado esse comportamento foi observado também na análise dos resultados experimentais. A condição de máxima redução na tensão superficial foi obtida para menores valores de C/N e maiores níveis de agitação.

#### 4.4.2 Planejamento experimental duas variáveis e dois fatores

Um novo planejamento experimental foi feito com a finalidade de verificar se o ponto C/N 3 e 250 rpm seria a condição ótima para a produção do biossurfactante. Os valores de tensão superficial analisados são os presentes na Tabela 4.4.

Os valores de porcentagem de redução da tensão superficial foram submetidos a uma regressão múltipla, obtendo os dados apresentados na Tabela 4.6.

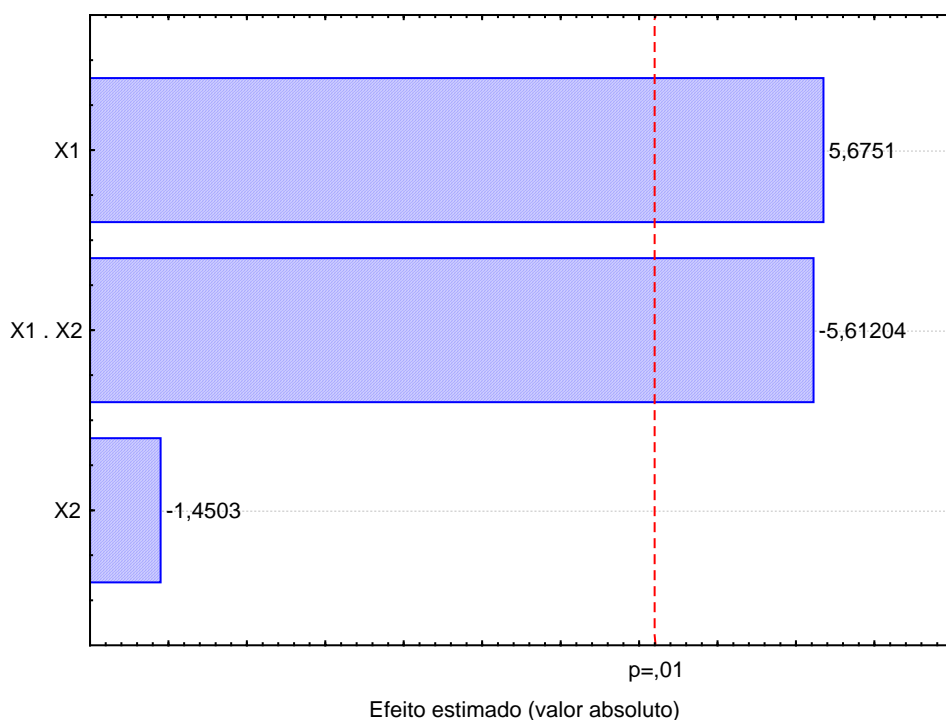
**Tabela 4.6.** Dados da porcentagem da redução da tensão superficial

Fatores	Efeito	Std. Err	T(4)	P	-99%	+99%
Constante ( $\beta_0$ )	42,15000	0,396469	106,3135	0,000000	41,30479	42,99521
X <sub>1</sub> (C/N)	4,50000	0,792938	5,6751	0,004757	2,80958	6,19042
X <sub>2</sub> (AG)	-1,15000	0,792938	-1,4503	0,220584	-2,84042	0,54042
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> (C/NAG)	-4,45000	0,792938	-5,6120	0,004953	-6,14042	-2,75958

A partir dos dados da Tabela 4.6 pode-se obter a seguinte equação para modelar a redução percentual da tensão superficial:

$$\text{Redução na tensão superficial (\%)} = 42,15 + 2,25 X_1 - 0,575X_2 - 2,225XY + 1,25 \quad (4.3)$$

Para facilitar a visualização dos efeitos dos parâmetros, a Figura 4.8 apresenta o diagrama de Pareto. Os efeitos cujos retângulos estiverem a direita da linha divisória vermelha devem ser considerados na equação do modelo matemático da produção do biossurfactante.

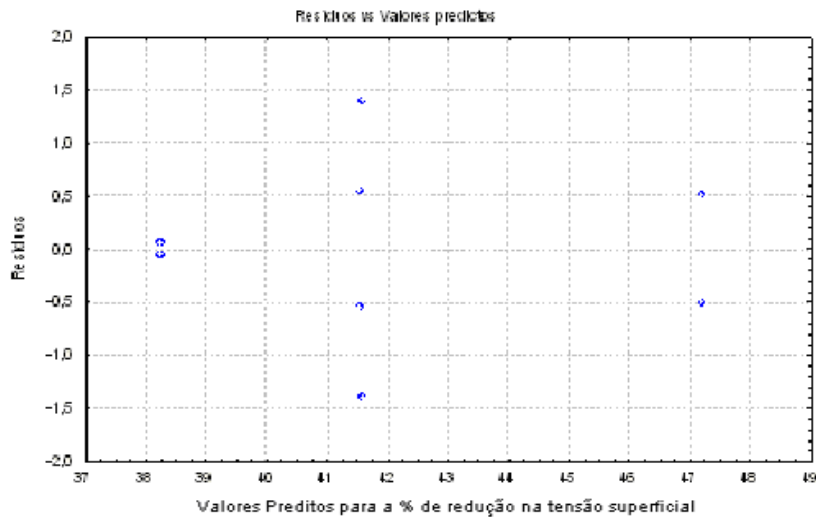


**Figura 4.8.** Diagrama de Pareto em função estatística do teste t.

Então, levando em consideração o nível de significância do teste t (superior a 10%), a variável  $X_2$  não é relevante para o processo, podendo ser eliminada do modelo. E mais uma vez, a variável isolada significativa do aumento do % de redução da tensão superficial foi a relação carbono/ nitrogênio no aumento.

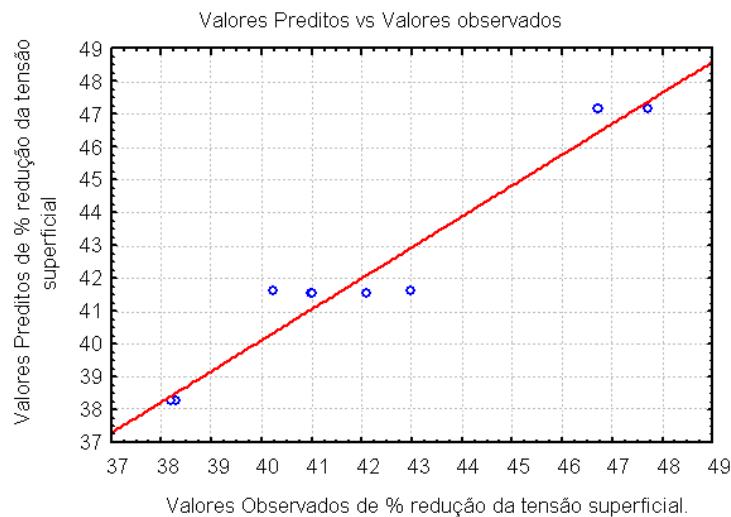
Neste planejamento, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para o modelo de regressão ajustado aos dados de redução percentual da tensão superficial é de 0,9427, isto é, cerca de 94,27% da variabilidade da % de redução da tensão superficial tem sido explicada quando os dois fatores relação C/N ( $X_1$ ) e agitação ( $X_2$ ), são usados

Na Figura 4.9, pode-se observar que a variância é constante uma vez que os resíduos se encontram distribuídos aleatoriamente em torno do zero, não mostrando nenhuma tendência quanto à distribuição.



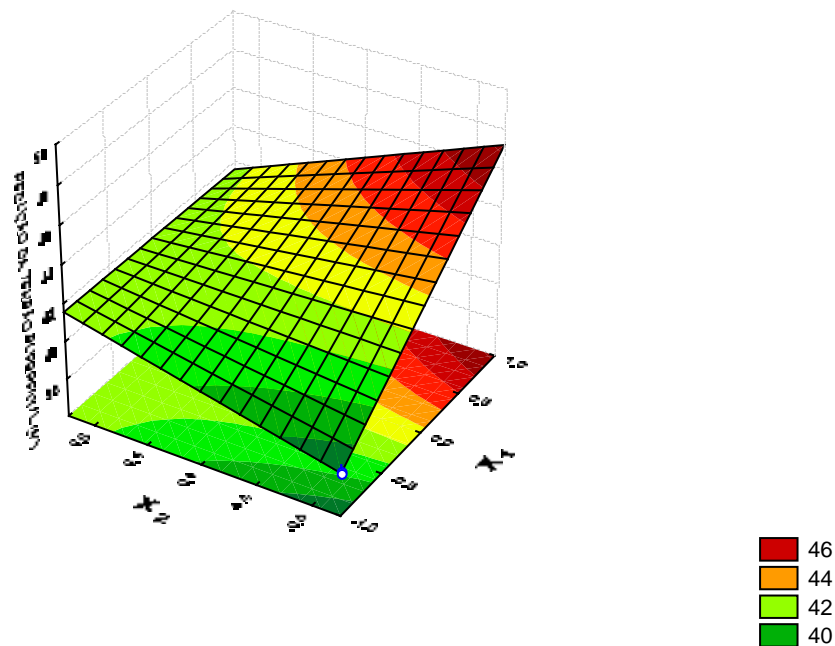
**Figura 4.9.** Distribuição dos resíduos relativa ao percentual da redução da tensão superficial.

Conforme pode ser verificado na Figura 4.10, os dados estão próximos à reta, o que caracteriza um ajuste satisfatório. Também tem-se que os valores fornecidos pelo modelo matemático estão próximos aos valores observados experimentalmente.



**Figura 4.10.** Valores preditos em função dos observados relativos ao percentual da redução da tensão superficial.

Observa-se que a tendência do melhor valor da resposta estudada é o maior valor da relação C/N e o menor valor de agitação Figura 4.11. Sendo interessante salientar que a interação entre as variáveis do eixo mostra-se relevante, já que este gráfico apresenta curvatura e além de definir melhor a região de maior porcentagem de redução.



**Figura 4.11.** Superfície de resposta para o percentual de redução da tensão superficial em função da relação C/N e do nível de agitação ( $x_1$ - variável relação C/N codificada;  $x_2$ - variável agitação codificada).

Esta análise estatística reforça os resultados obtidos com o planejamento experimental anterior, indicando que, dentre os fatores estudados, o parâmetro relação carbono/nitrogênio é o que exerce maior influência na produção do biossurfactante. É importante enfatizar que o ponto de máximo de produção do bioproduto é atingido quando a variável C/N está próxima de 3. Esses dados corroboram que a condição nutricional é de suma importância para o bioprocessamento, porque influencia no metabolismo microbiano favorecendo a produção do bioproduto.

Ramana *et al.* (1989) observaram que relações C/N baixas suportam bom crescimento microbiano da cepa *P. aeruginosa* CFTR-6, mas produzem uma quantidade de biotensoativos (glicolípido) pequena, enquanto que a relação C/N de 38 mostrou-se ótima para a produção destes compostos.

Outros métodos de planejamento experimental são relatados na literatura para melhorar a produção de surfactantes. Um exemplo interessante é o trabalho de Wei, Lai e Chang (2006) que utilizou o planejamento experimental Taguchi para otimizar a concentração de elementos traços ( $Mg^{+2}$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{+2}$  e  $Fe^{+2}$ ) a fim de intensificar a produção da surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332. Os autores verificaram que a concentração de surfactina dobrava de 1,74 g/L para 3,34 g/L quando  $Mg^{+2}$  e  $K^+$  estavam presente no meio de produção.

#### 4.5 Variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) para as diferentes velocidades de agitação

Estes testes tiveram como proposta avaliar a disponibilidade de oxigênio em função da velocidade de agitação aplicada, para meio formulado com a relação C/N 3. A Tabela 4.7 mostra que o valor de  $k_La$  aumentou com a elevação da velocidade agitação. Isto é devido à maior turbulência do sistema líquido, que leva a uma diminuição da espessura da película líquida ao redor da bolha gasosa de oxigênio e, conseqüentemente, diminui a resistência à sua transferência de massa (ANNA, 2005).

**Tabela. 4.7.** Valores de  $k_La$  em função da agitação

Agitação (rpm)	$k_La^*$ ( $s^{-1}$ )
50	0,113
150	0,146
250	0,170
300	0,191

\* T = 30 °C

A linhagem *B. licheniformis* JF2 apresentou a capacidade de produzir composto tensoativo, tanto em condição de aerobiose quanto de anaerobiose, diminuindo a tensão superficial do meio de 70 para 28 mN/m (JAVAHERI *et al.*, 1985). Porém, Lin *et al.* (1994) demonstraram que a síntese do lipopeptídeo é afetada pela concentração de O<sub>2</sub> dissolvido, sendo altamente inibido por teores de O<sub>2</sub> dissolvido de 80%.

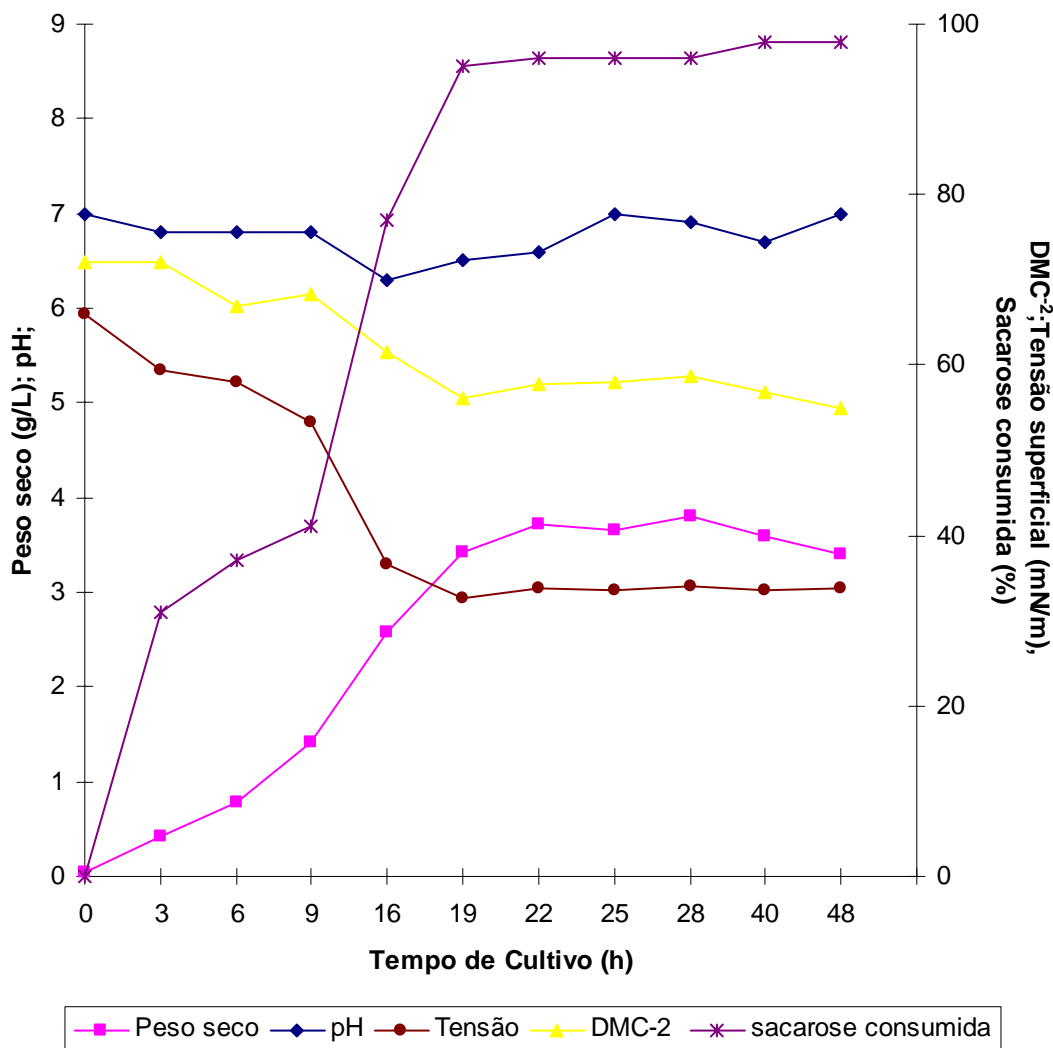
Yeh, Wei e Chang (2006), utilizando a linhagem *B. subtilis* ATCC 21332, obtiveram máxima concentração de surfactina produzida, cerca de 160 mg/L, nas condições de agitação e aeração, de 300 rpm 1,5 vvm, respectivamente. Nesta condição o valor de  $k_{La}$  foi de 0,0132 s<sup>-1</sup>. Esses autores relataram também que a produção da surfactina diminuiu consideravelmente ao cultivar a cepa sob agitação de 350 rpm e aeração de 1,5 vvm, correspondendo a valor de  $k_{La}$  de 0,139 s<sup>-1</sup>

Estes resultados demonstram a importância da agitação quando o processo fermentativo é conduzido em frascos Erlenmeyer a fim de disponibilizar oxigênio dissolvido para o metabolismo microbiano, mas sobretudo de se otimizar esta condição de modo a obter o máximo de produção no menor custo. Estima-se que o custo referente à aeração dos meios corresponde a cerca de 20% do custo total do processo fermentativo.

#### **4.6 Cinética da produção de biosurfactante**

A partir dos dados da relação C/N e agitação otimizados pela análise estatística foi realizado um estudo cinético a fim de estabelecer o comportamento da bactéria durante o processo fermentativo. A cinética foi realizada em frascos sob agitação de 250 rpm, empregando meio constituído de açúcar cristal e sulfato de amônio, na relação C/N de 3.

A Figura 4.12 mostra os perfis referentes ao crescimento da bactéria, consumo de substrato, e síntese do composto tensoativo a partir da variação da tensão superficial e da diluição micelar crítica.



**Figura 4.12.** Cinética da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* YRE 207.

Nas condições do ensaio, a bactéria apresentou fase exponencial de crescimento com duração de 19 h, atingindo o valor máximo de biomassa de 3,7 g/L em peso seco ao redor de 22 h. Neste ponto, o consumo de sacarose era praticamente total, correspondendo a 95%.

A síntese do composto tensoativo ocorreu concomitantemente ao crescimento celular, conforme indicado pelos perfis da tensão superficial e da diluição micelar crítica (DMC), com início na fase exponencial de crescimento e fim na fase estacionária. O valor mínimo de tensão superficial de 32,7 mN/m foi alcançado em 19 h de processo; coincidentemente, o valor da  $DMC^2$  também foi o menor neste ponto, de cerca 55 mN/m.

Aqui, impõe-se uma breve digressão. A concentração micelar crítica (CMC) é o ponto específico e relativo a um dado biossurfactante, quando a adição de maior



quantidade deste bioproduto à solução não leva mais à diminuição da tensão superficial, por causa da formação de uma camada unimolecular tomando toda a superfície líquida. Já a diluição micelar crítica (DMC) representa a diluição, dentre uma série de diluições decimais do bioproduto, que provoca um aumento significativo da tensão superficial do líquido, ou seja, o ponto a partir do qual ocorre a subtração das moléculas do bioproduto sobre a superfície do fluido. Portanto, a DMC serve como medida indireta da produção do biossurfactante por estar diretamente relacionada com a mudança de sua concentração. Por isso, é recorrente por alguns autores a menção da DMC como indicativo indireto da quantidade de biossurfactante presente no meio fermentado (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Cooper e Goldenberg (1987) obtiveram resultados similares já que a produção do biossurfactante também teve início na fase exponencial de crescimento tanto de *B. cereus* IAF 346 quanto de *Bacillus* sp. IAF 343, para cultivos realizados em meio mineral contendo 10 g/L de sacarose. No entanto, Reis, Servulo e de França (2004) observaram que a formação de biossurfactante, produzido pela linhagem *B. subtilis* ATCC 6633, somente teve início decorridas 24 h, ou seja, no final da fase exponencial de crescimento; sendo que o valor mínimo foi atingido em torno de 50 h de cultivo.

Os perfis cinéticos apresentados na Figura 4.12 indicam que a produção de biossurfactante pela linhagem *B. subtilis* YRE207 é associada ao crescimento celular, ocorrendo em curto período, a partir de matéria-prima renovável e de baixo custo. Portanto, é possível sugerir que o biossurfactante produzido é um metabólito primário corroborando as observações feitas por Cooper *et al.* (1981) e Roubin *et al.* (1989).

Makkar e Cameotra (1997) também verificaram que a linhagem de *B. subtilis* MTCC 2423, em condição de termofilia, foi capaz de crescer e produzir biossurfactante em meio contendo 20 g/L de sacarose.

Ainda de acordo com a Figura 4.12, pode-se observar um constante declínio do pH inicialmente ajustado em 7,0 até 6,3, a cerca de 3 horas de serem atingidos os valores máximos de biomassa e biossurfactante. A partir deste instante, teve início um aumento gradativo do pH, retornando ao valor inicial decorridas 25 h, e mantendo-se praticamente inalterado no restante do período monitorado. Variação similar de pH foi observada por Noah *et al.* (2005), a partir do cultivo de uma linhagem de *B. subtilis* em efluente proveniente do processamento de batatas durante 70 h de processo fermentativo.

A condição nutricional estudada, consistente em C/N 3 e agitação 250 rpm, favoreceu o processo de esporulação da linhagem, sendo seu percentual máximo alcançado de 73,6 %, decorridas 16 horas de produção do biossurfactante.

#### **4.7 Análise cromatográfica do biossurfactante produzido**

Ensaio preliminar para determinar a presença de surfactina dos meios fermentados foi feito por análise cromatográfica. Na Figura 4.13, podem ser observados os perfis cromatográficos da surfactina comercial (Sigma) e do composto tensoativo obtido na condição C/N=3 e agitação de 250 rpm.

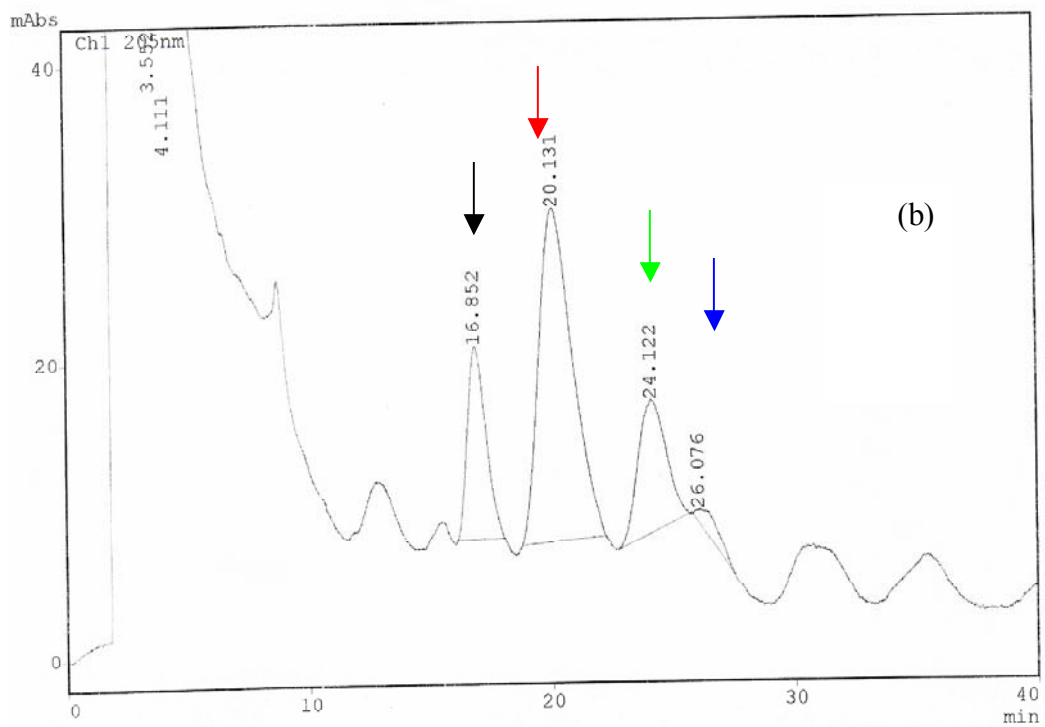
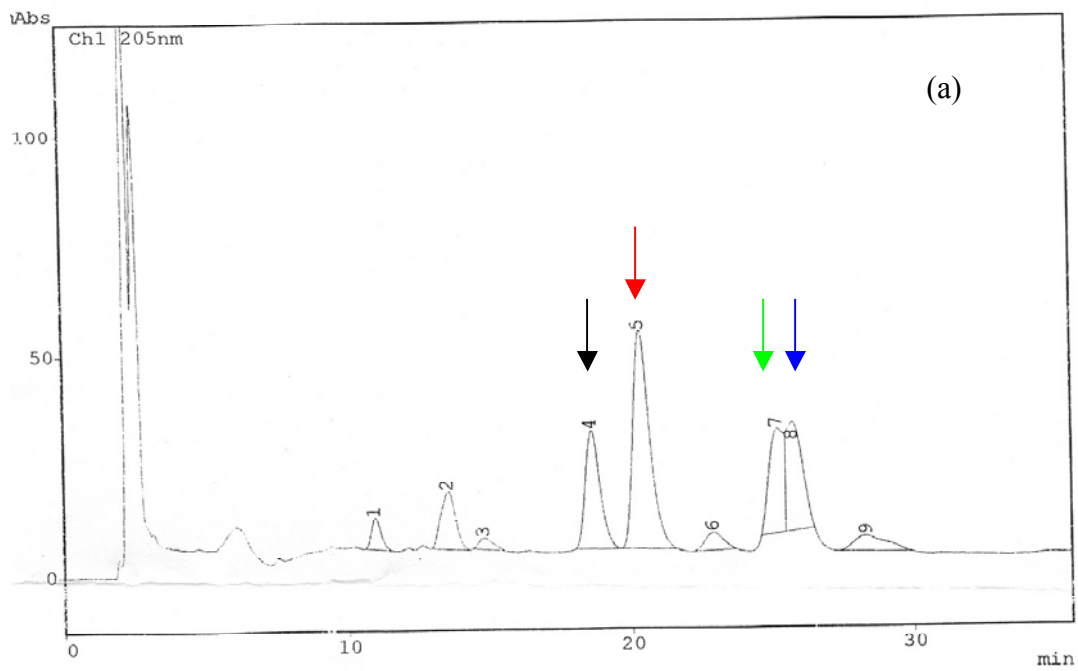
Nota-se que a surfactina da Sigma apresenta nove picos de retenção. Comparativamente, o composto produzido neste estudo apresentou semelhança em quatro picos de retenção (número do pico/ tempo de retenção) do padrão (Sigma), a saber: 4/18,593; 5/20,316; 7/25,207 e 8/25,753. Ambos os cromatogramas apresentam picos em diferentes tempos de retenção, o que comprova a existência de diferentes isômeros. Por outro lado, apresentam apenas 4 picos, com similaridade aos preponderantes na surfactina padrão. Este resultado confirma que o composto tensoativo pode apresentar diferente estrutura molecular dependendo da linhagem e das condições empregadas durante o processo fermentativo. Por isso, é possível que o composto obtido neste trabalho apresente diferentes propriedades físico-químicas, o que poderá proporcionar outros tipos de aplicação. Obviamente, serão necessárias mais investigações para comprovação.

Weï e Chu (1998) observaram perfis cromatográficos semelhantes para surfactina obtida a partir da linhagem *B. subtilis* ATCC 21332 e do produto comercial da Sigma, apresentando também nove picos dos quais oito nos mesmos tempos de retenção.

Kowall *et al.* (1998) separaram diferentes isoformas da surfactina, as variações apresentadas estão na posição 7 do anel peptídico onde foram encontrados os aminoácidos: L-Val, L-Leu ou L-Ile. Essas variações tornam as isoformas dos lipopeptídeos uma potente fonte de aplicação biotecnológica e farmacêutica.

A utilização da membrana de 10 kDa é justificada pela característica dos surfactantes se associarem em uma forma macroestrutura durante a CMC. Os biossurfactantes associados em micelas podem ser retidos por membranas de poros maiores como os da membrana utilizada neste trabalho. Em alguns estudos este procedimento de recuperação do biossurfactante pode atingir até 70% quando as moléculas já estão em quantidade correspondente a CMC (ISA *et al.*, 2007).

Chen, Chen e Juang (2007) constataram que ao utilizarem membranas de ultrafiltração de 100 kDa, conseguiam reter a surfactina associada em micelas. E, pelo uso do sistema de nanofiltração (membranas MWCO com poros menores que 1kDa) conseguiram reter monômeros do lipopeptídeo. Após o procedimento de separação do bioproduto, foram recuperados 72% da surfactina produzida, com mais de 83% de pureza.



**Figura 4.13.** Perfil cromatográfico a) da surfactina fornecida pela Sigma e b) da amostra C/N=3 e 250 rpm após a ultrafiltração em membrana de 10 kDa.

## 4.8 Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido

Uma das vantagens dos biossurfactantes em comparação aos seus similares químicos é a de manter suas propriedades tensoativas em condições extremas de temperatura e pH. Esta característica propicia uma maior amplitude de aplicações, além de ser fundamental para uso na recuperação do petróleo.

Na Tabela 4.8 estão representados os valores de tensão superficial do caldo fermentado livre de células, em diferentes valores de pH e temperatura. Pode-se observar que nos valores extremos de pH, 9 e particularmente 3, houve uma ligeira elevação do valor da tensão superficial em função do tempo de exposição, indicando alteração das propriedades do composto tensoativo. Nos outros dois valores de pH o efeito foi ainda menor. Note-se que, na maioria das condições os resultados de 6 e 24 h são similares. Também não houve variação expressiva em função da temperatura.

Joshi *et al.* (2008) verificaram que a tensão superficial do composto tensoativo produzido pela linhagem *B. subtilis* R1 se manteve em 33 mN/m em valores de pH entre 6 e 12, na temperatura de 80°C e 7% de salinidade.

Nitschke e Pastore, (2006) observaram aumento da tensão superficial no pH 9,0, enquanto nos valores de 5 e 7, a tensão superficial do mosto permaneceu estável. Cabe ressaltar, como nota ilustrativa, que este biossurfactante ficou estável durante 2 anos em temperaturas abaixo de zero.

Os mostos que tiveram seu pH ajustado a 3 apresentaram formação de um precipitado, provavelmente do lipopeptídeo na sua forma bruta. Nitschke e Pastore (2006) observaram o mesmo comportamento para o biossurfactante produzido pela linhagem *B. subtilis* LB5a, em pH abaixo de 5.

Esses resultados indicam que o biossurfactante produzido apresenta razoável estabilidade ao pH, mas sobretudo à temperatura.

**Tabela 4.8.** Estabilidade da atividade tensoativa do biossurfactante produzido por isolado *B.subtilis* em diferentes pH e temperaturas

Tempo	pH = 3,0			pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	10°	30°	50°	10°	30°	50°	10°	30°	50°	10°	30°	50°
<b>1h</b>	41,7	41,3	38,9	33,5	35,8	37,2	36,2	34,8	34,8	38,5	38,0	38,0
<b>6h</b>	37,6	39,8	38,8	36,2	33	34,8	37,6	36,7	34,4	39,4	39,4	37,6
<b>24h</b>	39,8	39,4	42,5	35,8	34,8	35,8	38,0	38,0	35,8	40,3	38,5	38,0
<b>*TS<sub>i</sub></b>	34,5			33,3			34,2			38,2		

- Tensão superficial inicial

Em função destes resultados, claro está que o comportamento da molécula de biossurfactante, em diferentes níveis de acidez ou basicidade, e submetida a diferentes temperaturas, apresentou comportamento satisfatório, o que permite vislumbrar sua aplicação por ampla gama de setores industriais, incluindo-se aí a recuperação terciária do petróleo, além da biorremediação, atividade altamente em voga na atualidade, devido à grande preocupação ambiental que anima a humanidade. Obviamente, será necessária uma avaliação mais minuciosa para definir as possíveis aplicações.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Com base nas análises dos resultados, pode-se concluir que:

- A matéria-prima –açúcar cristal – permitiu o crescimento da linhagem isolada de *Bacillus subtilis* YRE 207, com formação de produto com características tensoativas;
- Dentre as fontes de nitrogênio testadas - nitrato de sódio, nitrato de amônio, levedura residual cervejeira, uréia e nitrato de amônio, esta última foi a mais indicada para a síntese do composto tensoativo a partir de açúcar cristal;
- As condições otimizadas de relação C/N e agitação para a fermentação de meio constituído de açúcar e nitrato de amônio pela linhagem *B. subtilis* YRE207, definidas através de análise estatística, foram 3 e 248 rpm, respectivamente;
- O biossurfactante produzido foi capaz de formar emulsões estáveis em petróleo tipo árabe leve em água;
- O máximo de produção do biossurfactante, correspondendo à tensão superficial de 32,7 mN/m e diluição micelar crítica (DMC<sup>-2</sup>) de 55 mN/M, foi alcançada em 19 h;
- Análise cromatográfica do composto tensoativo produzido pela linhagem YRE207 mostrou perfil similar ao da surfactina comercializada pela Sigma;
- O biossurfactante produzido apresentou estabilidade razoável em pH de 5 a 9, e temperatura de 10 a 50<sup>0</sup>C.

## CAPÍTULO 6: SUGESTÕES

- Estudar diferentes metodologias para recuperação do biossurfactante;
- Quantificação do composto tensoativo produzido nas condições do planejamento;
- Realizar a modelagem do processo utilizando como resposta a quantidade real de biossurfactante produzido;
- Caracterizar as moléculas do biossurfactante, definindo os aminoácidos presentes;
- Realizar a extrapolação de escala do processo fermentativo;
- Avaliar o comportamento da comunidade microbiana na presença do bioproduto através de ensaios de biorremediação;
- Determinar o potencial do produto obtido em ensaios de bioengraduação
- Avaliar a toxicidade do biossurfactante produzido;
- Verificar a possibilidade do seu emprego nos setores alimentício e de cosmético.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-RUWAIDA, A.S.; BANAT, I.M.; HADITIRTO, S.; KHAMIS, A. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant-producing *Rhodococcus bacterium*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.7, p. 53-61, 1991.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v.22, p.313-316, 2000.
- AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p.749-754, 2000.
- AMÉZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, H.M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Effect of culture on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v.48, p.237-241, 2007.
- ANNA, L.M.M.S. Produção e aplicação de ramnolipídios na remediação de solos impactados por óleo. Orientador: Nei Pereira Jr., D.Sc. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ/Escola de Química-EQ, 2005, Tese (Doutorado em Ciências), 2005.
- \_\_\_\_\_.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA Jr, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.1-10, 2002.
- \_\_\_\_\_.; SEBASTIAN, G. V.; FREIRE D. M. G.; MENESES, E. P.; ALVES, T.L. M. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA 1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p.90-93, 2001.
- 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**, v. 31, n.3, p. 488-494, 1968.
- ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiology Review**, v. 45, p.180-209, 1981.
- BANAT, I.M. Les biosurfactants plus que jamais sollicités. **Biofutur**, v.108, p.44-47, 2000.
- \_\_\_\_\_. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. **Bioresource Technology**, v. 51, n.5, p.1-12, 1995.

- \_\_\_\_\_. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v.15, n.6, p.591-594, 1993.
- \_\_\_\_\_.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.495-508, 2000.
- BAPTISTA, S.J. Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel. Orientadora: Denize Dias de Carvalho e Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D.Sc. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ/Escola de Química-EQ, 146 p., Tese (Doutorado em Ciências), 2007.
- BARROS, C.F.F.; QUADROS, C. P; MARÓSTICA Jr. M.R.; PASTORE, G.M. Surfactin: chemical, technological and functional properties for food applications. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n, 2. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422007000200031&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422007000200031&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 02 Março de 2008. doi: 10.1590/S0100-40422007000200031, 2007.
- BEHRING, J.L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I.O. Adaptation of the drop-weight method for the quantification of surface tension: a simplified apparatus for the CMC determination in the chemistry classroom. **Química Nova**, v.24, n. 3, p.492-495, 2007.
- BERTRAND, J.C.; BONIN, P.; GOUTX, M.; GAUTHIER, M.; MILLE, G. The potential application of biosurfactants in combating hydrocarbon in marine environments. **Research in Microbiology**, v.145, n.1, p.53-56, 1994.
- BESSON, F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*. Evidence for aminoacid activating enzymes. **Biotechnology Letters**, v.14 n.11, p.1013-1018, 1992.
- BODOUR, A.A.; BARAJAS, C.G.; JIORLE, M.E.; PAULL, A.K.; SOMOGYI, A.; TRINH, L.N.; BATES, R.B.; MAIER, R.M. Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactant produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p. 114-120, 2004.
- BOLES, B.M.; THOENDEL, M.; SINGH, P.K. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas putida* from biofilms. **Molecular Microbiology**, v.57, p.1210-1223, 2005.
- BRANDA, S.S.; GONZALEZ-PASTOR, S.J.E.; BEN-YEHUDA, S.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.11621-11626, 2001.
- CHRISTOFI, N.; ISHIVA, I.N. Microbial surfactants and their use in field of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 915- 929, 2002.

- CLAUS, D.; BERKELEY, R.C.W. In: KIEG, N.R.; HOLT, J.G. (ed). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, London: Ed Williams, Wilkins Co., v. 2, p.1004-1130, 1984.
- CHEN, H.; CHEN, Y.; JUANG, R. Separation of surfactin from fermentation broths by acid two-stage dead-end ultrafiltration processes. **Journal of Membrane Science**, v. 299, p.114-121, 2007.
- COOPER, C.M.; FERNESTROM, G.A.; MILLER, S.A. Performance of agitated gas liquid contactors. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 504-509, 1944.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.224-229, 1987.
- \_\_\_\_\_. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, v.3, n. 5, p. 145-149, 1986.
- \_\_\_\_\_.; PADDOCK, D.A. *Torulopsis petrophilum* and surface activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n.8, p. 1426-1429, 1983.
- \_\_\_\_\_.; MacDONALD, C.R.; DUFF, J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactant from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, n.3, p. 408-412, 1981.
- \_\_\_\_\_.; ZAJIC, J.E.; GERSON, F. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n.1, p 4-10, 1979.
- DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28 n.4-5, p. 346-354 2001.
- \_\_\_\_\_.; 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**, v. 25, p. 322-329, 1999.
- DAVEY, M.E.; CAIAZZA, N.C.; O'TOOLE, G.O.; Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture. **Journal Bacteriol**, v.185, p. 1027-1036, 2003
- DE ROUBIN, M.R.; MULLIGAN, C.N.; Gibbs, B.F. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity. **Canadian Journal Microbiology**, v. 35, p. 854-859, 1989.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.1, p. 47-64, 1997.
- DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEU, Y.; JACQUES, P.; THONART, P.; PAQUOT, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from

*Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.152, p. 3-10, 1999.

EPA. **Soil remediation**. This guideline has been prepared to assist environmental consultants and their clients with ex situ soil bioremediation in South Australia. November, 2005. EPA 589/05.

FIECHTER, A. Integrated systems for biosurfactant synthesis. **Pure and Applied Chemistry**, v.64, p. 1739-1743,1992

FINNERTY, W.R.; SINGER, M. Microbial enhancement of oil recovery. **Biotechnology**, v.1, p. 47-54, 1983.

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

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

FREDEZZI, S.M.G. Produção de metabólitos antimicrobianos e de isolados provenientes da terra preta antropogênica da amazônia ocidental. Orientadora: Siu Mui Tsai. Piracicada. Universidade de São Paulo- USP/Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 117 p. Tese.(Doutorado em Ciências), 2006.

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

GOVERNO eleva mistura de álcool à gasolina para 25% dia 1º, por Márcio Rodrigues. Folha on-line. <http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u303977.shtml> São Paulo. Acessado 01 de março de 2008.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n.2, p. 301-305, 1984.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 443-448, 1986.

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advances Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 33, p. 53-93, 1986.

HEALY, M.G.; DEVINE, C.M.; MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources Conservation and Recycling**, v. 18, p. 41-57, 1996.

HESTER, S. IB mMarket forecast. **Industrial Bioprocessing**, v. 23, n. 5, p. 3, 2001.

- ISA, M.H.M.; CORAGLIA, D.E.; FRAZIER, R.A.; JAUREGI, P. Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. **Journal of Membrane Science**, v. 296, p. 51-57, 2007.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR A.; DESAI A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 195-199, 2008.
- KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 973-976, 1969.
- KANTIN, R. Poluição aquática por detergentes: aspectos gerais. Rio de Janeiro: **Engenharia Sanitária**, v. 19, n. 1, p. 82-85, 1980.
- KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. (1999) Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 116-126.
- KENNETH, T. (2005) In: Text Book of Bacteriology. University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net>. Acesso em 11 de novembro de 2005.
- KIM, S.H.; KIM, J.Y.; KIM, BAE, H. J.; YI, H.; YONN, S.H.; KOO, B.S.; KWON M.; CHO, J.Y.; LEE, C.; HONG, S. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 865-871, 2007.
- \_\_\_\_\_.; LIM, J. E; LEE, S.O; LEE, J.D; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactant from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 2000.
- KITAMOTO, D.; FUZISHIRO, T.; NAKANE, H.Y.T.; NAKAHARA, T. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 4, p. 305-310, 1992.
- KOSARIC, N. Biosurfactants. In: Rehm, H.J.; Reed, G. (eds). **Biotechnology**, cap. 17, 1996.
- LIN, S.C. Biosurfactant: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.
- \_\_\_\_\_.; Carswell, K.S., Sharma, M.M., Georgiou, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2 **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 281-285, 1994.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Production Biosurfactant at mesophilic and thermophilic by a strain *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Biotechnology**, v. 20, p. 48-52, 1998.

- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Biotechnology**, v.18, p. 37-42, 1997.
- MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica. **Química Nova**, v. 24, n.1, p, 87-93, 2001.
- MERCADE, M.E; MANRESA, M.A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of American Oil Chemical Society**, v.71, p 61-64, 1994.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; ROBERT, M.; ESPUNY, M.J.; DEANDRES, C.; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (Oome) – new substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 43, p. 1-6, 1993.
- MORKES, J. Oil–spills – whose technology will clean up. **R & D Magazine**, v. 35, p. 54-56, 1993.
- MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- \_\_\_\_\_.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.
- \_\_\_\_\_.; GIBBS, B.F. In: Biosurfactants Production, Properties, Applications. **Factors Influencing the Economics of Biosurfactants**. Kosaric, N. (ed.), Marcel Dekker, New York, 329-371, 1993.
- MURKHERJEE, A. K.; DAS, K. e SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactans. **TRENDS in Biotechnology**, v.24, n.11, 509-515, 2006.
- \_\_\_\_\_.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology** vol. 54, n. 3, p. 479-489, 2005.
- NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.9, p. 3240-3244, 1995.
- NEVES, E.; FORGIARINI, E.; SCHOENHALS, M.; CAMPREGHER, N.; GUZZI, R. Biossurfactantes, disponível no site: [http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_pos2004/biossurfactantes/biossurfactantes.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2004/biossurfactantes/biossurfactantes.htm). 2004. Acesso em maio de 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. Biosurfactantes a partir de resíduos agroindústrias. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 63-68, 2003.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p.772 - 776, 2002.
- NOAH, K. S.; VRUHN, D. F.; BALA, G. A.; Surfactin production from Potato Process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p.465-473, 2005.
- OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, p.209-214, 1995.
- OLIVEIRA, F. J. S.; VAZQUEZ, L.; CAMPOS, N. P.; DE FRANÇA, F. P. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* FR using palm oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.129-132, p. 727-737, 2006.
- PELCZAR, M. J. J. , CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiology Concepts and Applications**, 5 Ed. New York. Ed. McGraw-Hill, inc, 1993.
- PETROBRAS- relações com investidor. [http:// www2.petrobras.com.br/ri/port; destaquesoperacionais/exploraçãoprodução/manualprocedimentos\\_definições.asp](http://www2.petrobras.com.br/ri/port;destaquesoperacionais/exploraçãoprodução/manualprocedimentos_definições.asp#) #. Acessado em 01 de março de 2008.
- PETRÓLEO supera US\$ 100 em Londres e excede US\$ 101 em Nova York por JULIANA CARDOSO. Valor On-line, O Globo, Rio de Janeiro, 02 de junho 2008. Disponível em:[http://oglobo.globo.com/economia/mat/2008/02/29/petroleo\\_supera\\_us\\_100\\_em\\_londres\\_excede\\_us\\_101\\_em\\_nova\\_york-426020608.asp](http://oglobo.globo.com/economia/mat/2008/02/29/petroleo_supera_us_100_em_londres_excede_us_101_em_nova_york-426020608.asp). Acesso em: 02 de março de 2008.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.
- \_\_\_\_\_.; MICHEL, G. Controlled biosynthesis of Val7- and Leu7-surfactins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 515-517, 1992.
- PORTER, M. R. Handbooks of biosurfactants. New York. Champman & Hall, 2a. ed, p. 324, 1994.
- RAMANA, V.K.; KARANTH, N.G. Production of biosurfactant by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. **Biotechnology Letters**, v.11, n.6, p. 437-442, 1989.
- REIS, F.A.S.L. Estudo da síntese de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Orientadora: Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D.Sc. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ/Escola de Química-EQ, 108 p., Dissertação (Mestrado em Ciências), 1998.

- \_\_\_\_\_.; SÉRVULO, E.F.C.; DE FRANÇA, F.P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113-116, p. 899-912, 2004.
- ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; BOSCH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.11, n.12, p. 871-874, 1989.
- ROSA, S.E.S. O debate recente sobre o pico da produção mundial de petróleo. **Revista do BNDS**, v. 14, n. 28, p.171-200, 2007.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Technology**, v. 52, p.154-162, 1999.
- ROSEN, M.J. Surfactants and interfacial phenomena. 2º ed., Jonh Wiley & Sons, New York, p.431, 1978.
- THOMAS, J.E. Fundamentos de engenharia de Petróleo. 2 º ed., Rio de Janeiro:Interciência; PETROBRAS, 2004.
- TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in presence of syntetic surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 258-263, 1994.
- SCHRAMM, L.L. Surfactants: fundamentals and applications in the petroleum industry. Cambridge University Press. United Kingdom, 2000.
- SERAFIM, F. G.; AVILA, L. R. M.; ZERBETTO, M.; MAXIMIANO, A. A. Registro de produtos biorremediadores 1072. Congresso brasileiro de microbiologia, Brasília, DF, 2007.
- SEVERO, J.R. Disponível no site: <http://www.cna.org.br/site/noticia.php?n=3535>. Acessado em 24 de fevereiro de 2008
- SHENNAN, J.L.; LEVI, J.D In: In Situ Enhanced Recovery. **Biosurfactants and Biotechnology**, Marcel Dekker, New York, p. 163-180, 1987.
- SHEPHORD, R., ROCKEY, J., SHUTHERLAND, I.W., ROLLER, S. Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, n.40, p.316-320, 1995.
- SINGER, M.E.V.; FINNERTY, W.R. Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus species* H13-A. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p.741-745, 1990.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v.25,p. 99-121, 2007.



- SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential application of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.
- SISSININO, C. L. S. Destino dos resíduos sólidos urbanos e industriais no estado do rio de janeiro: avaliação da toxicidade dos resíduos e suas implicações para o ambiente e para a saúde humana. Rio de janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Tese (Doutorado em Ciências), 2002.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.24, p. 604-620, 2006.
- VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.12, p. 6210-6219, 2002.
- VOOENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation on enveloped viruses by surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v. 25, p.289-297, 1997.
- WEI, Y-H.; LAI, C-C.; CHANG, J-S Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATTC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, n.1, p.40-45, 2006.
- \_\_\_\_\_.; CHOU, C-L.; CHANG, J-S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p.146-154, 2005.
- \_\_\_\_\_.; CHU, I.M. Mn<sup>+2</sup> improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p.479-482, 2002.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 22, p.724-728, 1998.
- YEH, M.; WEI, Y-H.; CHANG, J-S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p.1799-1805, 2006.
- ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v. 1, p.87-107, 1984.
- ZHANG, J.; LEE, S.H.; GROSS, R.A.; KAPLAN, D. Surface properties of emulsan-analogs. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p.759-765, 1999.
- ZOZIM, Z., GUTNICK, D.L., ROSENBERG, E. Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. **Biotechnology Bioengineering**, v. 24, p.281-292, 1982.