



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014014185-5 A2

(22) Data do Depósito: 11/06/2014

(43) Data da Publicação: 19/04/2016
(RPI 2363)



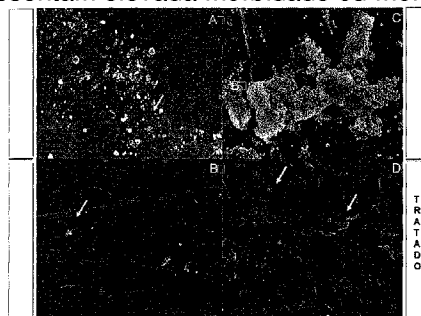
(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR BACILLUS SUBTILIS ATCC 19659 E USO PARA DISRUPTURA DE BIOFILME

(51) Int. Cl.: C12P 21/04; A61K 38/08; A61K 38/12; A61P 31/04; A61L 27/34; (...)

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

(72) Inventor(es): PAULO AFONSO GRANJEIRO, ADRIANO GUIMARÃES PARREIRA, MAURO EZIO EUSTÁQUIO PIRES, DANIEL BONOTO GONÇALVES, CIBELE GARCIA BASTOS, JULIANA TEIXEIRA DE MAGALHÃES

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR BACILLUS SUBTILIS ATCC 19659 E USO PARA DISRUPTURA DE BIOFILME. A presente invenção refere-se a um processo de produção de surfactina por isolados de Bacillus subtilis ATCC 19659 com propriedades anti-adesiva e antimicrobiana sobre isolados formadores de biofilme (Staphylococcus aureus ATCC 29213, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 e Escherichia coli ATCC 25922) em peças de aço inox e titânio de uso ortopédico. Além disso, a substância produzida tem grande potencial para aplicação no campo da saúde, uma vez que está relacionada com a redução de formação de biofilmes e, por conseguinte, com a redução da incidência de infecções em próteses ortopédicas, cujas intervenções cirúrgicas apresentam elevada morbidade ou mortalidade.



“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 19659 E USO PARA DISRUPTURA DE BIOFILME”

[001] A presente patente de invenção refere-se a um processo de produção de surfactina por isolados de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 com propriedades anti-adesiva e antimicrobiana sobre isolados formadores de biofilme (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922) em peças de aço inox e titânio de uso ortopédico.

[002] É sabido que as infecções sobre implantes ortopédicos representam complicações de grande impacto clínico e econômico para o paciente e para a sociedade em geral (Dal-Paz, K.; Oliveira, P.R.D.; De Paula, A.P.; Emerick, M.C.S.; Pécora, J.R.; Lima, A.L.L.M, *Economic impacto of treatment for surgical site infections in cases of total knee arthroplasty in a tertiary public hospital in brazil*. Brazilian journal of infections diseases, v.14, p. 356 – 359, 2010.). Revisão em artroplastias por infecção representa um custo 2,8 vezes maior que a revisão por soltura asséptica, sendo que a soltura séptica representa um custo 4,8 vezes maior que o custo da artroplastia primária (Bozic, K.J.; Ries, M.D. *The impact of infection after total hip arthroplasty on hospital and surgeon resource utilization*. The Journal of Bone and Joint Surgery, v.87-A, n. 8, p.1746-1751, 2005.).

[003] A prevalência estimada de infecções em artroplastias varia na literatura de 0,5% a 7,5% (Lentino, J. *Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists*. Clinical Infectious Disease, v.36, p. 1157-1161, 2003.). A incidência das infecções varia de acordo com o local da cirurgia e tipo de procedimento, variando de 2 a 30% em incidência de infecções nos pinos em fixações percutâneas, em torno de 3% para cirurgias com enxertos ósseos e menor valor nas artroplastias, variando de 1 a 2% (Hickok, N. J.; Shapiro, I. M. *Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, p. 1165–1176,

2012.). Fatores de risco são influenciados por variáveis como características e estado de saúde paciente, procedimento e características do ambiente hospitalar (Hanssen, A.D.; Rand, J.A. *Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty*. Instr Course Lect, v.48, p. 111-122, 1999; Salvati, E.A.; Gonzalez Della Valle, A.; Duncan C.P. *The infected total hip arthroplasty*. Instr Course Lect. v.52, p.223-245, 2003). Implantes ortopédicos estão sujeitos a infecções crônicas associadas a biofilmes bacterianos, que só podem ser erradicados por remoção traumática do implante acompanhada por terapia com antibióticos intravenosos, uma vez que é ineficiente a ação dos antimicrobianos na região mais interna do biofilme (Ehrlich, G.D. *Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections*. Clinical Orthopaedics and Related Research, v.437, p.59-66, 2006.). Alternativas têm caminhado no sentido de se tratar as superfícies destes materiais com biosurfactantes, a fim de se inibir a adesão bacteriana sobre as superfícies destes implantes.

[004] Os biosurfactantes (BS), compostos tensoativos produzidos por microrganismos, são moléculas que possuem uma região hidrofílica e outra hidrofóbica e por isso reduzem a tensão interfacial entre duas superfícies, alterando as propriedades das mesmas com as quais entram em contato (Maniasso, N. *Ambientes micelares em química analítica*. Química Nova, v. 24, n. 1, p.87-93, 200; Nitschke, M.; Pastore, G.M. *Biosurfactantes: propriedades e aplicações*. Química Nova, v. 25, n. 5, p.772-776, 2002; Rivardo, F.; Turner, R.J.; Allegrone, G.; Ceri, H.; Martinotti, M.G. *Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by Bacillus spp. Prevents biofilm formation of human bacterial pathogens*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 32, p.32-37, 2009). As principais vantagens do uso de biosurfactantes em comparação aos tensoativos sintéticos residem na natureza biodegradável, baixa toxicidade e atividade antimicrobiana que, aliada à atividade tensoativa, podem não só inibir a adesão, mas também a sobrevivência dos microrganismos contaminantes (Costa, S.G.V.O.; Nitschke, M.; Contiero, C. *Fats and oils wastes as substrates*

for biosurfactant production. Food Science and Technology, v. 28, p.34-38, 2008). Dentre os biossurfactantes conhecidos, destacam-se a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, e os ramnolipídeos, produzidos por isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, ambos de natureza aniônica, sendo que a surfactina pertence à classe dos lipopeptídeos e os ramnolipídeos são glicolipídeos (Barros, F. F. C.; Mano, M. C. R.; Bicas, J. L.; Dionisio, A.; Quadros, C. P.; Uenojo, M.; Neri, I. A. & Pastore, G. M. *Production and Stability of Bacillus subtilis Biosurfactants Using Cassava Wastewater in a Pilot Scale*. Journal of Biotechnology, v. 131S, p. 172-S173, 2007; Jarvis, F. G.; Johnson, M. J. *A glyco-lipide produced by Pseudomonas Aeruginosa*. The Journal of the American Chemical Society, v. 71, n. 12, p.4124-4126, 1949).

[005] Bactérias identificadas como *B. subtilis* são caracterizadas como Gram-positivas, formadoras de esporos, produtoras de ácidos e álcoois e anaeróbias facultativas, capazes de utilizar nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons (Sonenshein A. L.; Hoch, J. A.; Losick R. *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria*. Biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993). Uma importante característica da fermentação em *B. subtilis* é a produção de etanol, lactato e acetato, além de 2,3-butanodiol, um álcool que atua como um co-surfactante agindo sinergicamente com outros surfactantes presentes no meio, aumentando a eficiência e a tolerância dos tensoativos à salinidade (Cruz, R. H.; Boursier, I.; Moszer, F.; Kunst, A.; Danchin, P. *Anaerobic transcription activation in Bacillus subtilis: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms*. Embo Journal, v. 14. p. 5984–5994, 2000).

[006] A surfactina foi um dos primeiros biosurfactantes a serem descritos, inclusive Arima e colaboradores (1968) (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, p.488-494, 1968)

descobriram um novo composto biologicamente ativo produzido por isolados de *Bacillus subtilis*, denominado surfactina devido à sua grande atividade superficial. Sua estrutura química foi completamente elucidada somente um ano após sua descoberta. É sintetizada por várias espécies do gênero *Bacillus*, especialmente *Bacillus subtilis*, principalmente durante a fase estacionária de crescimento, quando os nutrientes são limitantes (Walencka, E.; Rózalska, S.; Sadowska, B.; Rózalska, B. *The influence of Lactobacillus acidophilus-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation*. Folia Microbiologica, v. 53, n. 1, p. 61-66, 2008). Pertence à classe dos lipopeptídios e sua estrutura é composta por um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, contendo de 12 a 16 átomos de carbonos. Apresenta resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, leucina e valina, e dois resíduos que lhe conferem carga negativa, ácidos aspártico e glutâmico. É produzida naturalmente como uma mistura de vários peptídeos com diferentes comprimentos da cadeia alifática (Walencka, E.; Rózalska, S.; Sadowska, B.; Rózalska, B. *The influence of Lactobacillus acidophilus-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation*. Folia Microbiologica, v. 53, n. 1, p. 61-66, 2008; Barros, F. F. C.; Quadros, C. P.; Maróstica, M. R. J.; Pastore, G. M. *Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos*. Química Nova, v. 30, n. 2, p.409-414, 2007a)

[007] Isolados de *B. subtilis* apresentam elevada capacidade de produção de biosurfactantes, tanto em condições aeróbias quanto em condições anaeróbias (Batista, F. M. *Produção de biosurfactantes por Bacillus subtilis com elevada eficiência na mobilização de óleo pesado*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2008.; Fernandes, P. L. *Produção de biosurfactantes por Bacillus spp. em Condições Anaeróbia*. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2007; Lima, T. M .S. *Determinação Estrutural, Toxicidade, Biodegradabilidade e Eficácia de Biosurfactantes na Remoção de Fenantreno e Cádmio do Solo*. Tese (Doutorado) – Curso de Pós Graduação em

Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2008; Rossmann, M. *Otimização da Produção e Propriedades Tensoativas de Biosurfactantes mm Meios à Base de Melaço e Manipueira*. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, UFV, Viçosa, 2008). São capazes de produzir três tipos principais de biosurfactantes: surfactina, iturina e fengicina, com pequenas variações estruturais entre eles, embora suficientemente capazes de afetar suas atividades de modo apreciável (McInerney, M. J., Nagle, D. P. & Knapp, R. M. *Microbially enhanced oil recovery: past, present, and future*. In: M. Magot and B. Ollivier, *Petroleum Microbiology*, American Society for Microbiology Press, Washington, D. C. p. 215-237, 2004b). A surfactina, pertencente à classe dos surfactantes lipopeptídicos, é constituída por uma porção lipídica e outra proteica na molécula, merecendo destaque dentre os demais biosurfactantes (McInerney, M. J.; Duncan, K. E.; Youssef, N. H.; Fincher, T.; Maudgalya, S.; Folmsbee, M. J.; Knapp, R. M.; Simpson, D. R.; Ravi, N.; Nagle, D. P. *Final report to the U. S. Department of Energy: development of microorganisms with improved transport and biosurfactant activity for enhanced oil recovery*. DE-FC-02NT15321 R 02. University of Oklahoma, Norman, OK, 2003). Apresenta uma série de funções biológicas, como propriedades bactericidas, fungicidas, antivirais, antitumorais e inibitórias na formação de coágulos (BARROS *et al.*, 2007b). Graças a sua excepcional atividade tensoativa de superfície recebeu aquela denominação. A surfactina é composta por uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em sua estrutura e em suas propriedades físico-químicas em virtude de variações no tamanho de suas cadeias, ao local de ligação dos componentes hidroxi-ácidos graxos e a substituições dos aminoácidos componentes do anel (Barros, F. F. C.; Mano, M. C. R.; Bicas, J. L.; Dionisio, A.; Quadros, C. P.; Uenojo, M.; Neri, I. A. & Pastore, G. M. *Production and Stability of Bacillus subtilis Biosurfactants Using Cassava Wastewater in a Pilot Scale*. *Journal of Biotechnology*, v. 131S, p. 172-S173, 2007b).

[008] A presente invenção refere-se a um processo de produção de surfactina por isolados de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 com propriedades anti-adesiva e antimicrobiana sobre isolados formadores de biofilme (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922) em peças de aço inox e titânio de uso ortopédico. Consultando a literatura, verificou-se que não há relatos que relacionam o efeito antimicrobiano ou bacteriostático do biossurfactante produzido por isolados de *B. subtilis* ATCC 19659 sobre microrganismos de importância médica; nem do uso do composto tensoativo em peças de aço inox e de titânio de uso ortopédico e odontológico, para o propósito de inibição da adesão de microrganismos formadores de biofilme; e do uso do meio mineral M2 modificado na produção de biossurfactantes por isolados de *B. subtilis* ATCC 19659, o que gerou melhores resultados comparativamente ao mesmo meio de cultivo original (não modificado).

[009] Quanto à propriedade anti-adesiva de biossurfactantes, tem-se observado diversos estudos que avaliam a inibição/redução da adesão de células formadoras de biofilme a diferentes materiais. Cloete e Jacobs (2001) (Cloete, T. E.; Jacobs, L. *Surfactants and the attachment of Pseudomonas aeruginosa to 3CR12 stainless steel and glass*. Water SA, v.27, p. 21–26, 2000.) relataram que o pré-condicionamento de superfícies de aço inoxidável e de vidro com surfactantes tem potencial para impedir a adesão bacteriana. Tensoativos não-iônicos e aniônicos foram avaliados na prevenção da adesão de isolados de *P. aeruginosa* às superfícies daqueles materiais sendo que os surfactantes avaliados demonstraram mais de 90% de inibição da adesão. Nitschke e colaboradores (2009) (Nitschke, M., Araujo, L. V., Costa, S. G. V. A. O., Pires, R. C., Zeraik, A. E., Fernandes, A. C. L. B., et al. *Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces*. Letters in Applied Microbiology, 49, 241–247, 2009) também demonstraram redução de adesão de aproximadamente 25% de *L. monocytogenes* ATCC 29004 em superfície de aço inox pré-condicionada com surfactina de *B. subtilis* a 0,1%

(p/v), assim como Araujo et al. (Araujo, L.V., Abreu, F. Lins, U., Santa Anna, L.M.M.S, Nitschke, M., Freire, D.M.G. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. *Food Research International* 44: 481–488, 2011), utilizando a mesma superfície metálica, encontraram uma redução de 80% e 84% na adesão de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e ATCC 19112, respectivamente. Os resultados em nosso estudo comprovam que, na presença de surfactina, houve redução de adesão de 93% de *S. aureus* em peças de aço inox e de 90% em liga de titânio para *S. epidermidis*, mostrando que este biosurfactante apresenta maior atividade anti-adesiva.

[0010] Ainda testando a atividade anti-adesiva, Rivardo e colaboradores (2009) (Rivardo, F.; Turner, R.J.; Allegrone, G.; Ceri, H.; Martinotti, M.G. *Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by Bacillus spp. Prevents biofilm formation of human bacterial pathogens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p.32-37, 2009.), avaliaram o potencial de biossurfactantes lipopeptídeos V9T14 e V19T21, produzidos de *B. licheniformis* e *B. subtilis*, respectivamente, a fim de verificar a inibição da adesão de biofilmes de bactérias patogênicas em dispositivos MBEC, então, observaram que V9T14 promoveu inibição máxima de 97% na adesão de células de *E. coli* CFT073 com um pré-tratamento de 2,560µg/mL. Para V19T21 foi observada máxima inibição de adesão de 90% contra *S. aureus* ATCC 29213 com um pré-tratamento de 160-320µg/mL com aquele biossurfactante. Em contrapartida, o pré-condicionamento de 10mg/mL de surfactina em aço inox promoveu inibição máxima de 93,2% na adesão de células de *E. coli* ATCC 25922, e 99,9% e 99,4% de inibição na adesão de células de *S. aureus* ATCC 29213, em peças de aço inox e titânio, respectivamente.

[0011] A redução da adesão de células formadoras de biofilme (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228) em peças de aço inox e titânio, acima de 93% em relação ao controle, revela que a surfactina, produzida por isolados de *Bacillus subtilis* ATCC 19659, também apresenta alta atividade anti-adesiva quando comparada com o estudo feito por Gomes e

colaboradores (2012). Em tal estudo, foi observada a redução da adesão de *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* de 42,0%, em microplacas de 96 poços de poliestireno, quando pré-condicionada com surfactina 0,25%. Após 2h de contato com surfactina na concentração de 0,1%, os biofilmes pré-formados de *S. aureus* foram reduzidas em 63,7%, *L. monocytogenes* em 95,9%, *S. Enteritidis* em 35,5% e da cultura de biofilme mista a redução foi de 58,5% (Gomes, M.Z.V, Nitschke, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. Food Control 25: 441-447, 2012).

[0012] Na patente EP2384335 (2011) foi demonstrada a redução de 97% de adesão de *E. coli* CFT073 com o uso do biosurfactante produzido a partir de *Bacillus licheniformis* V9T14 empregando-se dispositivos de polipropileno nos testes de adesão bacteriana. Enquanto que a surfactina, da presente invenção, inibiu, na concentração de 10mg/mL, 96% da formação de biofilme para os isolados de *E. coli* ATCC 25922 em peças de titânio de uso ortopédico.

[0013] Não obstante, na patente WO2006063176 (2006) também foi encontrada capacidade de atividade anti-adesão parecida, em que o pré-tratamento de cateteres com fago 456, com e sem cátion bivalente suplementar, resultou em reduções significativas de log de 4,47 ($p < 0,0001$) e 2,34 ($p = 0,001$) em estafilococos CFU/cm², respectivamente. Estes representam mais do que 99% de redução no número de células viáveis em ambos os casos. A diferença está no material utilizado para pré-condicionamento, uma vez que essa patente realizou testes de atividade anti-adesão em um polímero, enquanto que a presente patente utiliza como material o aço inox e titânio.

[0014] A presente invenção apresenta maior capacidade de redução de células formadoras de biofilme em comparação com outros biosurfactantes descritos na literatura. O biofilme de *P. putida* PCL1445 em policloreto de vinila (PVC) foi reduzido e inibido após pré-condicionamento do biosurfactante putisolvin I, com efeito dependente da concentração, e redução de 52% na concentração de 1μM de biosurfactante e redução de 88% na concentração de 18μM de

biosurfactante, após 8h de incubação (Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Pickford, R. Derrick, J.P.; Lamers, G.E.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J. J. and Guido V. Bloemberg. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(1), 97–113, 2004). A presente invenção apresentou maior redução de células formadoras de biofilme. Em 2012, Janek, Lukaszewicz e Krasowska (Janek T., Lukaszewicz, M, Krasowska, A.. *Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium Pseudomonas fluorescens BD5*. *BMC Microbiology*, v. 12 (24), p. 1-9, 2012.), demonstraram o efeito anti-adesivo de Pseudofactin II, um biosurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens* BD5, proveniente da água doce do arquipélago Ártico de Svalbard. Pseudofactin II é um novo composto identificado como lipopeptídeo cíclico com um ácido palmítico ligado ao grupo amino terminal do aminoácido na oitava porção peptídica. Pseudofactin II reduziu a adesão a três tipos de superfícies (vidro, isopor e silicone) de estirpes bacterianas de: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis* e duas cepas de *Candida albicans*. O pré-tratamento de uma superfície de poliestireno com 0,5mg/ml de Pseudofactin II inibiu a adesão bacteriana em 36-90% e de *C. albicans* em 92-99%. A mesma concentração de Pseudofactin II desalojou 26-70% dos biofilmes preexistentes cultivados em superfícies não tratadas. Pseudofactin II também causou acentuada inibição da adesão inicial de *E. faecalis*, *E. coli*, *E. hirae* e *C. albicans* em cateteres uretrais de silicone. A concentração mais elevada (0,5mg/mL) causou inibição total do crescimento de *S. epidermidis*, inibição parcial (18-37%) de outras bactérias e 8-9% de inibição do crescimento de *C. albicans*. Prevenção de até 99% pode ser conseguida com 0,5mg/mL de Pseudofactin II. Além disso, Pseudofactin II dispersa biofilmes pré-formados, podendo ser utilizada como um desinfetante ou agente de revestimento de superfície contra a colonização microbiana de superfícies diferentes, por exemplo, implantes ou cateteres uretrais.

[0015] Além disso, a presente invenção dispensa o uso de microrganismos vivos, prevenindo-se de todos os efeitos adversos potenciais oriundos de sua aplicação, substituindo-os pelo uso de substâncias biológicas isoladas e com efeito surfactante que apresenta pronunciada atividade anti-adesiva, sobretudo para os isolados formadores de biofilmes de uso ortopédico. Em contrapartida, a patente EP2134657 (2009), que apresenta métodos e composições para prevenir e/ou reduzir a formação de biofilmes em superfícies e/ou a proliferação de microrganismos planctônicos em ambientes aquosos, especialmente ambientes domésticos e industriais, usando um número significativo de estirpes de bactérias, verificando a capacidade de reduzir ou evitar a formação de biofilmes naqueles ambiente. A referida patente compreende um pequeno número de cepas do gênero *Bacillus* que são capazes de reduzir e / ou prevenir a formação de biofilmes e / ou a proliferação planctônica quando cultivadas em conjunto com microrganismos indesejáveis, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas Montelli*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio FischerII*, e / ou *Escherichia coli*.

[0016] Patentes que elucidam a aplicação da surfactina como fertilizantes e suas utilizações, também foram encontradas, porém não há indicação de uso do biosurfactante produzido por isolados de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 com atividade anti-adesão de biofilme (patentes WO2013050700, 2013; WO2013110132, 2013).

[0017] A presente invenção trata-se de um processo que se mostrou muito eficiente na redução da adesão de células formadoras de biofilme na superfície dos corpos de prova de aço inox e de titânio em mais de 99% para *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Outras vantagens frente às tecnologias existentes são: a simplicidade estrutural da substância; a alta capacidade de redução da tensão superficial; maior efeito em relação ao surfactante sintético (SDS 1mg/mL); a elevada atividade antimicrobiana em baixas concentrações de surfactina para *E. coli*-ATCC 25922, *S. aureus*-ATCC 29213 e *S. epidermidis*-ATCC 12228.

Descrição Detalhada da Invenção

[0018] Em um aspecto, a presente invenção contempla um processo de produção de surfactina, caracterizado por compreender etapas, na seguinte ordem: preparo de pré-inóculo, fermentação, incubação, centrifugação, precipitação ácida, centrifugação, extração, liofilização, dissolução, filtração.

[0019] Em suma, os isolados de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 devem ser cultivados em caldo Mueller Hinton a 30°C e 140rpm em Shaker por um período de 12h, a fim de se obter os pré-inóculos dos referidos isolados. Para a obtenção dos inóculos, deverão ser retiradas alíquotas de 100µL do pré-inóculo, diluídas em 900µL de água deionizada, com o objetivo de obter a determinada DO₆₀₀ (densidade óptica a 600nm). Os isolados bacterianos devem ser cultivados no meio MS modificado a 30°C, 140rpm por 72h. Em seguida, deve-se promover a precipitação do biosurfactante por ajuste de pH do meio de cultura, centrifugado e livre de células, para 2,0, empregando-se solução HCl 6,0M. O meio deve permanecer incubado overnight em geladeira a 4°C. Finalmente, o precipitado deverá ser ressuspendido em pH 7,5 e filtrado, a fim de obter o filtrado rico em biosurfactante.

[0020] Neste processo de produção dispensa-se o uso de microrganismos vivos, substituindo-os pelo uso de substâncias biológicas isoladas com propriedades anti-adesiva e antimicrobiana sobre isolados formadores de biofilme (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922) em peças de aço inox e titânio de uso ortopédico.

[0021] A invenção vai ser descrita a seguir por meio de ilustração do seguinte exemplo.

EXEMPLO 01:**Processo de produção de Surfactina**

[0022] Os isolados de *B. subtilis* ATCC 19659 empregados na produção de surfactina são cultivados em caldo Mueller Hinton, na faixa de temperatura de 28°C a 37°C e rotação de 100 a 200rpm em Shaker por um período de 10 a 14h, a fim de se obter os pré-inóculos dos referidos isolados. Para a obtenção dos inóculos, são retiradas alíquotas de 1 parte do pré-inóculo diluídas em 9 partes de água deionizada, e assim determinada a DO_{600} (densidade óptica a 600_{nm}), utilizando-se espectrofotômetro. Durante a etapa de avaliação da produção dos biosurfactantes pelos isolados bacterianos, os mesmos são cultivados nos diferentes meios a 28°C a 37°C e rotação de 100 a 200rpm em Shaker por um período de 10 a 14h.

[0023] Todas as culturas dos isolados bacterianos são mantidas sob refrigeração a 4°C em meio ágar-nutriente (Himedia®) de composição (g/L): extrato de levedura de 0,5 a 3,0; cloreto de sódio de 1,0 a 10,0; ágar de 10 a 20,0; extrato de carne de 1,0 a 3,0 e peptona de 2,0 a 7,0. Para a obtenção dos pré-inóculos e inóculos dos isolados estudados foi utilizado meio caldo Mueller Hinton (Himedia®) de composição (g/L): infusão de carne 300; caseína hidrolisada 17,5 e amido 1,5. Para a avaliação da produção dos biosurfactantes pelos isolados de *B. subtilis* foi selecionado o meio mineral M2 modificado, contendo glicose como fonte de carbono a 2,0% (p/v). O meio mineral M2 modificado é composto de (g/L): Na_2HPO_4 (2-3); KH_2PO_4 (1-2); $(NH_4)_2SO_4$ (0,5-1); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1-0,2); K_2SO_4 (0,3-0,4); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,01-0,02); $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,02-0,03); NaCl (0,1-0,2); Extrato de levedura (0,001-0,002); $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (0,01-0,02); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,525-0,530); $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,700-0,705); $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,1-0,2); H_3BO_3 (0,01-0,02); $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,015-0,020).

Tensão Superficial

[0024] A avaliação da tensão superficial dos biosurfactantes parcialmente purificados foi estimada por quantificação da tensão superficial pelo método do anel de *Du Nouy* (Cooper, D.G.; MacDonald, C.R.; Duff, S.J.B.; Kosaric, N. *Enhanced production of surfactin from Bacillus subtilis by continuous product removal and metal cation addition*. Appl. Environmental Microbiology, v. 42. p. 408-412. 1981), empregando-se Tensiômetro. Os testes foram realizados com três repetições para cada isolado em cada meio de cultura testado, sendo que cada repetição foi realizada em triplicata.

[0025] Na tabela 1 é possível observar o efeito da surfactina na diminuição da tensão superficial utilizando tensiômetro. O resultado da presente invenção foi melhor do que o observado para o estudo de Sriram e colaboradores (2011) (Sriram M.I.; Kalishwaralal K.; Deepak V.; Gracerosepai R.; Srisakthi K.; Gurunathan S. *Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain Bacillus cereus NK1*. Colloids Surf B Biointerfaces, v. 85(2), p. 174-81, 2011), onde o biosurfactante lipopeptídico produzido por isolados de *B. cereus* NK1 obtiveram como menor valor de tensão superficial 38mN.m⁻¹, embora estivessem trabalhando com meio de cultura rico.

Tabela 01. Valores de tensão superficial obtidos de sobrenadantes dos meios de cultivo M1, M2 modificado, M3 e ME inoculados com isolados de *B. subtilis* incubados a 37°C e 140rpm por 72h.

Isolado/Meios de cultura	M1 Média (SD) mN.m ⁻¹	M2 modificado Média (SD) mN.m ⁻¹	M3 Média (SD) mN.m ⁻¹	ME Média (SD) mN.m ⁻¹
Controle	71,03 (0,18)	71,73 (0,19)	70,44 (0,18)	60,46 (0,19)
<i>B. subtilis</i> ATCC 19659	49,97 (0,24)	33,61 (0,21)	51,8 (0,22)	51,98 (0,18)

Avaliação da formação dos biofilmes

[0026] Os corpos de prova de aço inoxidável e de titânio, assim como as bactérias *E. coli*-ATCC 25922, *S. aureus*-ATCC 29213 e *S. epidermidis*-ATCC 12228, foram cultivados em tubos de cultura contendo caldo Mueller Hinton, a fim de se induzir a formação de biofilmes na superfície daquelas peças. As peças foram assepticamente colocadas nos tubos de cultura, contendo o meio e suspensões bacterianas a 10^8 UFC ml⁻¹, incubados em Shaker a 140rpm e 37°C por 6, 12, 24 e 48 horas. Após os períodos de incubação, os discos foram retirados do meio de cultura e submetidos a banho de ultrassom a 40Hz por 20min em 5,0ml de solução fisiológica estéril a 0,85% (p/v). A partir de então, daquele líquido foram realizadas diluições da ordem de 10^{-1} a 10^{-5} e plaqueamentos em meio ágar nutriente, a fim de se quantificar as células viáveis presentes, constatando-se indiretamente a formação de biofilmes nas peças.

Efeito anti-adesivo

[0027] Com o interesse de se avaliar o efeito anti-adesivo dos biossurfactantes, foram realizados tratamentos dos corpos de prova, de aço inox e titânio, com a surfactina nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0 mg/mL, assim como para o controle (ausência de biossurfactante) e o uso de um controle positivo, como o surfactante sintético SDS 1,0mg/mL.

[0028] Na figura 1, para os isolados de *E. coli*, incubados na presença de peças de aço inox, observamos a tendência de maior formação de biofilme no controle, com o efeito anti-adesivo da surfactina dependente da concentração. Notamos que houve melhor efeito anti-adesivo do SDS em relação a surfactina na concentração de 0,1mg/mL, onde a redução da formação de biofilme foi de 22,8 e 13,7%, respectivamente. O efeito anti-adesivo da surfactina nas concentrações de 0,1 e 1,0mg/mL, mostraram eficiência aproximadamente 10 vezes menor comparados a concentração de 10mg/mL, sendo que nesta última concentração a capacidade de redução do biofilme foi de 93,2% (Figura 2). A

redução da formação de biofilme com pré-condicionamento de surfactina 10mg/mL foi aproximadamente 10 vezes maior em relação ao controle e ao SDS 1mg/mL. Para os isolados de *E. coli*, incubados na presença de peças de titânio, observamos a mesma tendência de melhor resposta anti-adesiva de acordo com o aumento da concentração de BS. Porém, o efeito da redução da formação do biofilme foi maior na presença do BS em relação ao SDS. A capacidade de redução de formação de biofilme foi de 42,9, 41,8 e 96,0% para as concentrações de BS de 0,1, 1,0 e 10,0mg/mL, respectivamente. Na concentração de BS 10mg/mL houve redução da adesão bacteriana cerca de 10 vezes maior quando comparada às demais concentrações de BS utilizadas, ao controle e ao SDS 1mg/mL. Uma análise de comparação de adesão bacteriana do isolado de *E. coli* nas peças de aço inox e de titânio demonstra uma maior adesão global, de aproximadamente 10x, nas peças de aço inox em relação às peças de titânio. Na concentração de surfactina 10mg/mL o efeito de redução de formação de biofilme foi maior para titânio em relação ao aço inox, sendo de 3,95 e 6,8%, respectivamente. Foi possível também observar que o efeito anti-adesivo em baixas concentrações de surfactina em peças de titânio foi mais pronunciado em relação às peças de aço inox.

[0029] Na figura 2 está apresentado o efeito de isolados de *S. aureus* em peças de aço inox na presença de diferentes concentrações de surfactina e SDS. Notamos que o efeito do SDS na redução do biofilme foi de 88,1%. Porém, o efeito foi maior na presença do BS, sendo de 99,6, 99,9 e 99,9% para as concentrações de 0,1, 1 e 10mg/mL, respectivamente. A redução da formação de biofilme com pré-condicionamento de BS 10mg/mL foi 10.000x maior em relação ao controle e 1.000x maior em relação ao SDS 1mg/mL. Para isolados de *S. aureus*, em peças de titânio, também foi possível observar o aumento do efeito anti-adesivo com o aumento da concentração de surfactina. A redução da formação do biofilme na presença do SDS 1mg/mL foi de 27,9%, porém o efeito foi mais acentuado na presença de surfactina, sendo de 42,6, 87,7 e 99,4% nas concentrações de 0,1, 1 e 10mg/mL, respectivamente. A redução da

formação de biofilme com pré-condicionamento de surfactina 10mg/mL foi aproximadamente 100x maior em relação ao controle e ao SDS 1mg/mL está demonstrada a comparação dos resultados de redução de adesão celular de *S. aureus*, obtidos para peças de aço inox e de titânio. Notamos que ocorreu maior adesão das células formadoras de biofilme, também, em peças de aço inox em relação às peças de titânio, sendo 100x maior. A atividade anti-adesiva do surfactina foi maior em peças de aço inox em relação às peças de titânio, sendo de 0,007 e 0,6% a quantidade de células formadoras de biofilme, respectivamente. O efeito anti-adesivo em peças de titânio foi menos pronunciado em relação ao aço inox, em baixas concentrações de surfactina.

[0030] Para isolados de *S. epidermidis*, incubados em peças de aço inox, também foi observada a tendência de melhor efeito anti-adesivo dependente da concentração de surfactina (Figura 3). Quando foi utilizado SDS 1mg/mL o efeito anti-adesivo foi de 25,5%. Porém, o efeito anti-adesivo foi maior na presença de surfactina, sendo de 52,7, 94 e 99,5% para as concentrações de 0,1, 1 e 10mg/mL, respectivamente. A redução da formação de biofilme com pré-condicionamento de surfactina 10mg/mL foi aproximadamente 100x maior em relação ao controle e ao SDS 1mg/mL. Para isolados de *S. epidermidis*, incubados na presença de peças de titânio, observamos a manutenção da tendência de melhor eficiência anti-adesiva dependente da concentração de surfactina. O efeito de redução da formação do biofilme foi de 48,6% na presença de SDS 1mg/mL, sendo um efeito maior que a concentração de BS 0,1mg/mL, que apresentou redução de 42,9%. Porém, para as concentrações de BS de 1 e 10mg.mL⁻¹ a redução foi de 71,4 e 99%, respectivamente. A redução da formação de biofilme com pré-condicionamento de surfactina 10mg/mL foi aproximadamente 10 vezes maior em relação ao controle e ao SDS 1mg/mL. Notamos que a adesão de biofilme em peças de aço inox foi 100 vezes maior do que em peças de titânio. A atividade anti-adesiva da surfactina foi maior em peças de aço inox em relação às peças de titânio, sendo de 0,5 e 1%, respectivamente.

[0031] A redução da adesão de biofilme pode ser confirmada por imagens de microscopia eletrônica de varredura de *S. aureus* ATCC 29213 sem tratamento com surfactina em peças de aço inox (Figura 4A) e peças de titânio (Figura 4C), e a redução da adesão na presença de 10.0mg/mL de surfactina em aço inoxidável (Figura 4B) e titânio (Figura 4D). Foi demonstrada redução de adesão de *S. aureus* ATCC 29213 em ambos os materiais, quando os peças foram pré-condicionadas com surfactina.

Antimicrobiano

[0032] A concentração mínima inibitória (MIC) da surfactina foi realizada por microdiluição e testada nas bactérias *E. coli*-ATCC 25922, *S. aureus*-ATCC 29213 e *S. epidermidis*-ATCC 12228 nas concentrações de 10, 100, 240 e 500µg/mL.

[0033] Para o preparo do inóculo, colônias isoladas dos microrganismos foram adicionadas a uma solução salina até atingir a turvação 0,5 da escala de *MacFarland*. Em seguida a concentração das células foi ajustada em meio *Yeast Malt Agar* (YMA), de forma que se obtivesse 10³ células/mL de leveduras e em meio Mueller Hinton (MH), para obter 10⁵ células/mL de bactérias.

[0034] O controle positivo para as leveduras continha o meio YMA + miconazol a 500µg/ml + leveduras e o controle positivo para bactérias continha, MH + estreptomicina a 900µg/ml + bactéria. Os controles negativos foram três: o primeiro continha o meio de cultura com o microrganismo; o segundo, o meio de cultura, o microrganismo e DMSO a 1% e o terceiro o meio de cultura o microrganismo e o tampão Tris-HCl do inibidor da protease. As placas foram incubadas a 37°C por 24h.

[0035] Na tabela 2 é possível observar o efeito da surfactina com atividade antimicrobiana para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 12228, sendo a concentração bactericida mínima (CBM) de

10, 240 e 240µg/mL, respectivamente. Destaca-se a atividade antimicrobiana para *E. coli* ocorrer em concentração bastante reduzida do biosurfactante.

[0036] Os resultados do antimicrobiano em conjunto com a atividade anti-adesiva são fundamentais para um efeito sinérgico para combater a adesão do biofilme nos implantes ortopédicos.

Tabela 2. Determinação da concentração bactericida mínima da surfactina em *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Microrganismo	Concentração bactericida mínima
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	240µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	240µg/mL

[0037] O presente pedido de patente poderá ser mais bem compreendido através da descrição das seguintes figuras:

[0038] A **FIGURA 1** representa a comparação da resposta de adesão celular de isolados de *E. coli* aos tratamentos com surfactina a 0,1; 1,0 e 10mg/mL, SDS a 1,0mg/mL e controle sobre peças de aço inox e titânio.

[0039] A **FIGURA 2** representa a comparação da resposta de adesão celular de isolados de *S. aureus* aos tratamentos com surfactina a 0,1; 1,0 e 10mg/mL, SDS a 1,0mg/mL e controle sobre peças de aço inox e titânio.

[0040] A **FIGURA 3** representa a comparação da resposta de adesão celular de isolados de *S. epidermidis* aos tratamentos com surfactina a 0,1; 1,0 e 10mg/mL, SDS a 1,0mg/mL e controle sobre peças de aço inox e titânio.

[0041] A **FIGURA 4** representa a micrografia eletrônica de varredura: A e B, da superfície das peças de aço inoxidável na presença de isolados de *S. aureus* ATCC 29213, indicados pela seta (ampliação 1000x), sem e com a adição de surfactina na concentração de 10,0mg/mL; C e D, da superfície das peças de titânio na presença de isolados de *S. aureus* ATCC 29213, indicados pela seta

(ampliação 1000x), sem e com a adição de surfactina na concentração de 10,0mg/mL (5000x ampliação).

Análises estatísticas

[0042] Médias e desvio padrão foram realizadas no *software Graphpad Prism*.

[0043] As análises estatísticas para verificar significância foram realizadas por meio de programa específico Epi-InfoTM versão 7, *software* de uso livre. As médias das variáveis numéricas foram comparadas usando ANOVA para amostras independentes. O nível de significância para todos os testes foi estabelecido em $p < 0,05$.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA caracterizado por compreender o uso de *Bacillus subtilis* ATCC 19659.
2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA, de acordo com a reivindicação número 1, caracterizado por compreender as seguintes etapas:
 - a) Preparo de pré-inóculo
 - b) Fermentação
 - c) Incubação
 - d) Centrifugação
 - e) Precipitação ácida
 - f) Centrifugação
 - g) Extração
 - h) Liofilização
 - i) Dissolução
 - j) Filtração
3. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA de acordo com as reivindicações números 1 e 2, caracterizado por cultivar o micro-organismo em caldo Mueller Hinton na faixa de temperatura de 28°C a 37°C e rotação de 100 a 200rpm em Shaker por um período de 10 a 14h.
4. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA, de acordo com as reivindicações números 1 e 2, caracterizado por cultivar o micro-organismo em meio mineral M2 modificado, contendo glicose como fonte de carbono a 2,0% (p/v); e compreende como meio mineral M2 modificado os seguintes compostos de (g/L): Na₂HPO₄ (2-3); KH₂PO₄ (1-2); (NH₄)₂SO₄ (0,5-1); MgSO₄.7H₂O (0,1-0,2); K₂SO₄ (0,3-0,4); CaCl₂.2H₂O (0,01-0,02); FeSO₄.7H₂O (0,02-0,03); NaCl (0,1-0,2); Extrato de levedura (0,001-0,002); MnSO₄.4H₂O (0,01-0,02); ZnSO₄.7H₂O (0,525-0,530); CuSO₄.7H₂O (0,700-0,705); CoCl₂.6H₂O (0,1-0,2); H₃BO₃ (0,01-0,02); Na₂MoO₄.2H₂O (0,015-0,020).

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA, de acordo com as reivindicações 1 a 4, caracterizado por compreender o uso deste biossurfactante em peças de aço inox e titânio para uso ortopédico.

FIGURAS

FIGURA 01

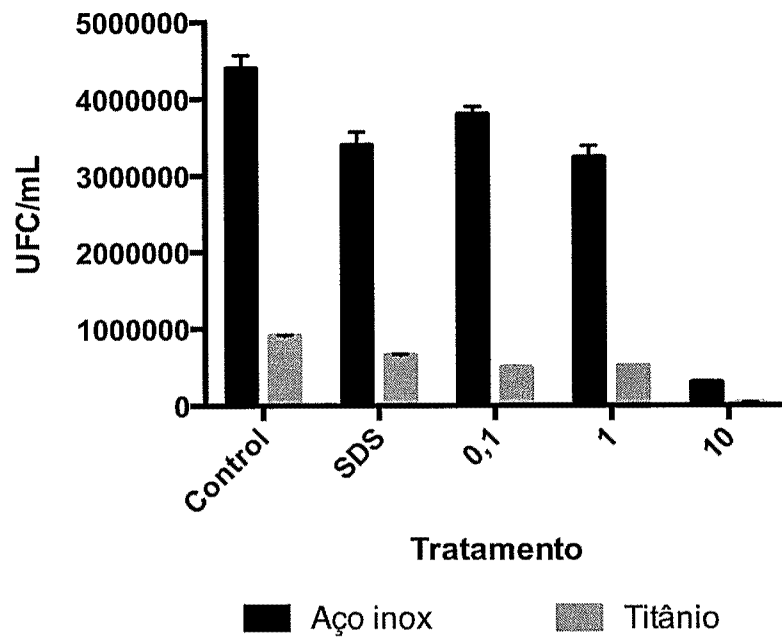
E. coli

FIGURA 02

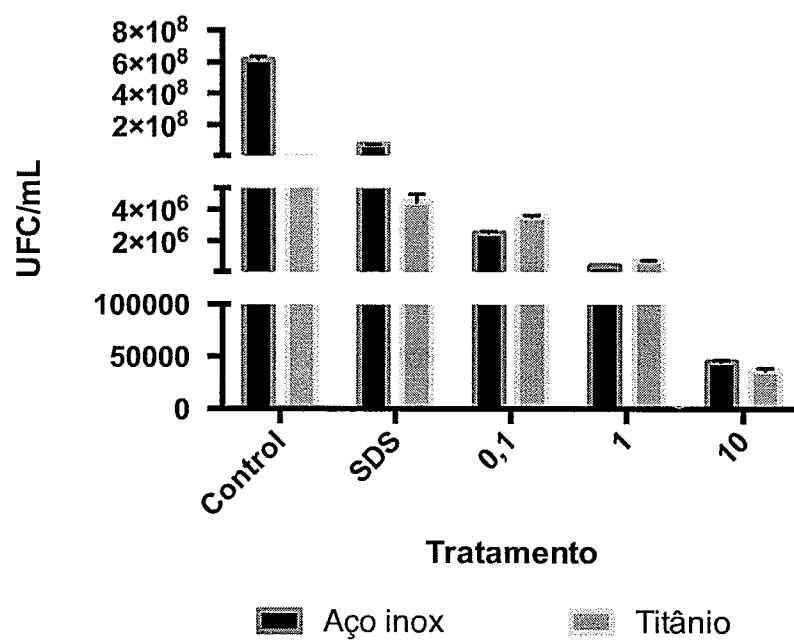
S. aureus

FIGURA 03

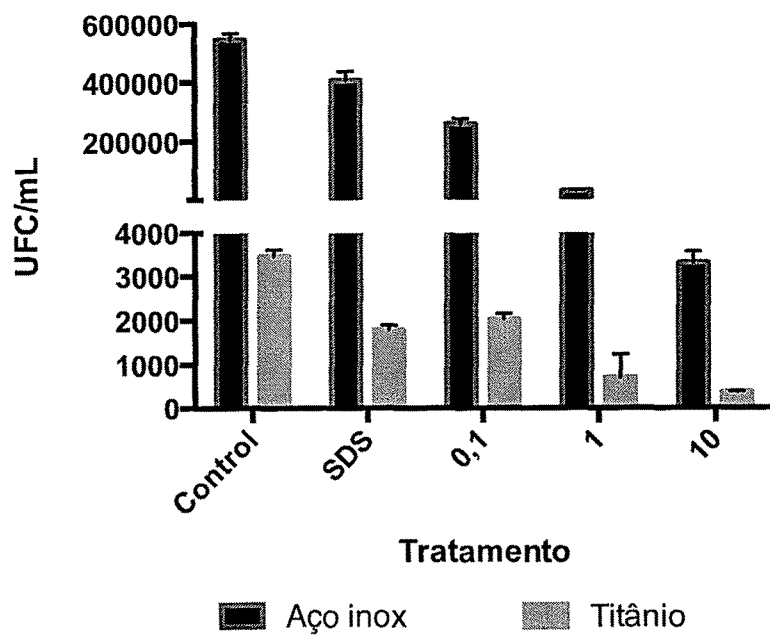
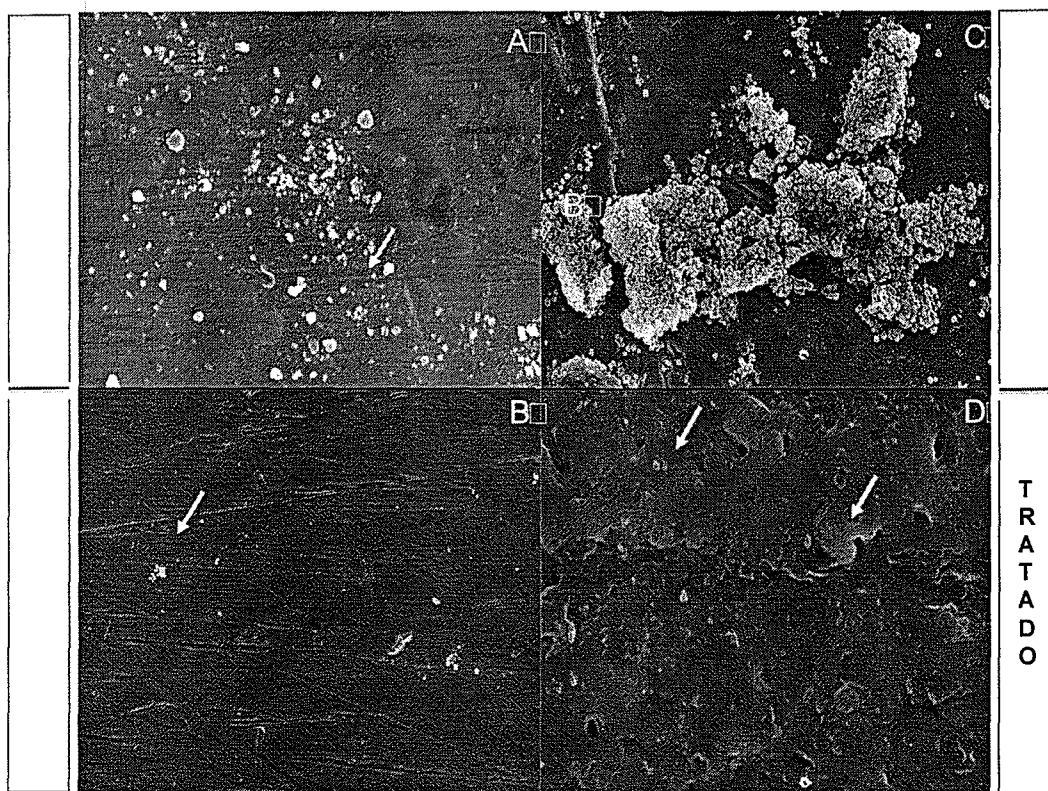
S. epidermidis

FIGURA 04



RESUMO

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *BACILLUS SUBTILIS* ATCC 19659 E USO PARA DISRUPTURA DE BIOFILME”

A presente invenção refere-se a um processo de produção de surfactina por isolados de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 com propriedades anti-adesiva e antimicrobiana sobre isolados formadores de biofilme (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922) em peças de aço inox e titânio de uso ortopédico. Além disso, a substância produzida tem grande potencial para aplicação no campo da saúde, uma vez que está relacionada com a redução de formação de biofilmes e, por conseguinte, com a redução da incidência de infecções em próteses ortopédicas, cujas intervenções cirúrgicas apresentam elevada morbidade ou mortalidade.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRYSHELEN BUGAY

**BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus* sp.:
ESTUDOS DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

**CURITIBA
2009**

CRYSHELEN BUGAY

**BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus* sp.:
ESTUDOS DE PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química ao Curso de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química - Área de Concentração em Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

**ORIENTADORA: Prof. Dr^a. NADIA
KRIEGER**

**CURITIBA
2009**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por mais esta conquista alcançada.

Carinhosamente aos meus pais, Luiz Tadeu Bugay e Roseliane Bugay, pelo exemplo de vida, por serem a luz do meu caminho, minha fonte de inspiração, pelo amor incondicional, dedicação, confiança e apoio em todos os momentos de minha vida.

Ao meu noivo, Paulo Franco Santini, pelo carinho, sinceridade, por acreditar em mim e por poder confiar-te meus pensamentos, decepções, realizações, sonhos e sempre poder contar contigo.

Aos meus irmãos, Juliano e Giulia, pela capacidade de renovarem em mim a esperança e a alegria a cada dia que passa.

A toda minha família pelo total apoio nos estudos e por sempre estarem presentes.

A minha orientadora professora Nadia Krieger, pela orientação e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Guilherme L. Sassaki e ao pós-doutorando Lauro M. de Souza, do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela ajuda nas análises utilizando CLAE, CG-EM e ESI-MS.

A professora Janete M. de Araújo (Departamento de Antibióticos – UFPE), pelo fornecimento da cepa utilizada nesse trabalho.

Aos amigos Arquimedes e Joel, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doumit, em especial, pela ajuda incondicional nos experimentos, nas estratégias e no entendimento deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório do LTEB pela amizade, paciência e força que muito me ajudaram.

As minhas amigas, Denize, Gisele, Graciela, Heveline, Jackqueline, Jaqueline, Maria Rosi e Vanessa, pelos momentos de descontração e boas risadas.

A todos os colegas e funcionários da Pós-Graduação do Departamento de Química.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

As empresas Arroz Frias, Cocamar, Corn Products Brasil e Usina de Alcool Melhoramentos, pelo fornecimento dos substratos sólidos utilizados neste trabalho.

A Corn Products Brasil e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Biossurfactantes são compostos que possuem aplicações potenciais em muitas áreas, pois são considerados não tóxicos e biodegradáveis, além de exibirem ótimas propriedades de superfície, como abaixamento de tensão superficial (TS) e interfacial (TI) entre duas fases (óleo-água) e excelente capacidade de emulsificação. Biossurfactantes têm composição variada, que depende do tipo de microrganismo, e são produzidos na forma de uma mistura de homólogos, responsável por suas propriedades. Cepas de *Bacillus* sp. são conhecidas por geralmente produzirem biossurfactantes do tipo lipopeptídeo, sendo o exemplo mais importante desta classe a surfactina, um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*. Este trabalho teve por objetivo o estudo da produção e a caracterização de biossurfactantes produzidos por cepas de *Bacillus* sp. utilizando os processos de fermentação submersa (FS) e de fermentação no estado sólido (FES). Inicialmente, para seleção das cepas, foram realizados testes de espalhamento da gota e cultivos para verificação do abaixamento da tensão superficial do meio de cultura em FS. Como não se conhecia a composição do biossurfactante, o acompanhamento das fermentações foi feito inicialmente por diluição micelar crítica (DMC), ou seja, o número de diluições necessárias para se alcançar a concentração micelar crítica (CMC). Nestes ensaios, o melhor resultado foi obtido com *B. pumilus* UFPEDA 448, utilizando glicerol como fonte de carbono, sendo que em 12 h de fermentação houve redução da tensão superficial do meio de cultura para 28 mN/m, obtendo-se 16 DMC. O biossurfactante contido no sobrenadante de cultura foi capaz de emulsificar a gasolina com elevada estabilidade, com índice de emulsificação, E_{48} , de 54%. Foi avaliado ainda o potencial de produção de biossurfactante por FES utilizando diferentes substratos sólidos, onde os melhores resultados foram obtidos com Okara (resíduo sólido da extração aquosa da soja) e com a mistura de Okara e espuma de poliuretano (9:1, m/m) (32 DMC). As análises estruturais, realizadas por ESI e CG-EM, demonstraram que o biossurfactante produzido por *B. pumilus* UFPEDA 448 é um lipopeptídeo composto por uma única isoforma, correspondente à Surfactina A, com sete aminoácidos ligados em ciclo na ordem Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu, e por cinco homólogos, com variação da cadeia do ácido graxo de 12 a 16 átomos de carbono (C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} e C_{16}), sendo os homólogos C_{14} e C_{15} os mais abundantes. Os resultados correspondentes à determinação estrutural da mistura de lipopeptídeos mostraram ainda que as diferentes condições de cultivo levaram à modificação das abundâncias relativas de cada homólogo. Em termos comparativos, a produção de biossurfactantes por FES, por volume de solução umedecedora, foi cerca de 2,4 vezes maior que a produção por FS. A CMC do biossurfactante produzido foi de $5,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mostrando sua eficácia, visto que, quanto menor é o valor de CMC, maior a eficiência do biossurfactante. A mudança na composição dos homólogos do biossurfactante não causou modificação nesta propriedade físico-química.

Palavras-Chave: Biossurfactantes, lipopeptídeos, *Bacillus pumilus*, Okara, fermentação no estado sólido, surfactina.

ABSTRACT

Biosurfactants have potential applications in many areas, since they are non-toxic and biodegradable, besides having a good capacity for lowering the surface tension of water or the interfacial tension at water-oil interfaces. They also have an excellent emulsifying ability. Many different biosurfactants are produced, depending on the type of microorganism used. Further, biosurfactants are typically produced as a mixture of homologous compounds. Strains of the genus *Bacillus* produce lipopeptide biosurfactants, the most important example of this class being surfactin, which is produced by *Bacillus subtilis*. The present work aimed to study the production of biosurfactants by strains of *Bacillus* grown in submerged culture and solid-state culture and to characterize the molecules produced. In an initial step for strain selection, the drop collapse method and the decrease of the superficial tension of the supernatants were utilized. Since a method for direct quantification of the biosurfactant had not yet been developed, the culture medium was serially diluted, with the dilution factor required to reach the critical micellar concentration (denominated critical micellar dilution, or "CMD") being used as an indicator of the amount of biosurfactant in the undiluted culture broth. The best result was obtained with *B. pumilus* UFPEDA 448, using glycerol as the carbon source: after 12 h the surface tension of the culture medium had been reduced to 28 mN/m, with a CMD of 16. The biosurfactant contained in the culture broth gave an emulsification index after 48 h against gasoline of 54%. The potential for the production of this biosurfactant in solid-state cultivation was tested with several solid substrates. The best results were obtained with Okara (solid residue of aqueous extract of soybean) and with a mixture of Okara with polyurethane foam (9:1 by mass). In this case the CMD was 32. Structural analyses performed by ESI and GC-MS, showed that the biosurfactant produced by *B. pumilus* UFPEDA 448 is a lipopeptide composed of a single isoform, this isoform corresponding to Surfactin A, with a cyclic peptide of seven amino acids linked in the order Leu-Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Glu. There were five homologues of this structure, with variations in the length of the fatty acid, which varied from 12 to 16 carbon atoms (C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅ and C₁₆). The homologues C₁₄ and C₁₅ were the most abundant. Different culture conditions led to the production of lipopeptide mixtures with different proportions of these homologues. When compared on the basis of the volume of liquid solution used, the production of biosurfactants by solid-state cultivation led to a yield that was 2.4-fold greater than that obtained in submerged culture. The critical micellar concentration (CMC) of the biosurfactant produced was 5.4 mg·L⁻¹ suggesting that it is an efficient surfactant. The change in the proportions of the homologues did not affect the CMC.

Key-Words: Biosurfactants, lipopeptides, *Bacillus pumilus*, Okara, solid-state culture, surfactin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de alguns tipos de biossurfactantes.....	18
Figura 2. Variação dos lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i>	21
Figura 3. Estrutura do principal homólogo (<i>iso</i> -C ₁₅) da surfactina.....	23
Figura 4. Estrutura do principal homólogo (<i>n</i> -C ₁₃) da iturina.....	24
Figura 5. Estrutura do homólogo <i>n</i> -C ₁₆ da fengicina.....	25
Figura 6. Lichenisina A: estrutura de uma isoforma da lichenisina e homólogo (<i>iso</i> -C ₁₅).....	26
Figura 7. Processo de extração do biossurfactante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448.....	35
Figura 8. Variação da tensão superficial do sobrenadante dos cultivos.....	43
Figura 9. Índice de Emulsificação (<i>E</i> %) do sobrenadante de cultura com vários hidrocarbonetos.....	45
Figura 10. Composição de aminoácidos presentes no biossurfactante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448. Cromatograma dos ésteres metílicos de aminoácidos acetilados.....	51
Figura 11. Composição de aminoácidos presentes no biossurfactante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448. Espectros de massa da fragmentação dos ésteres metílicos de aminoácidos acetilados.....	52
Figura 12. Homólogos presentes no biossurfactante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448.....	53
Figura 13. Íons esperados da fragmentação do homólogo C ₁₄ da Surfactina A. A) Espectro de massa do padrão da surfactina produzido por <i>Bacillus subtilis</i> ; B) Espectro de massa do homólogo C ₁₄ produzido por <i>Bacillus pumilus</i>	59
Figura 14. Cromatograma da análise por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) em luz UV 210 nm.....	61
Figura 15. Determinação das bandas do cromatograma da análise por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto isolado do <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448.....	62
Figura 16. Curva de calibração da concentração do padrão de surfactina produzido por <i>Bacillus subtilis</i> versus a absorbância a 210 nm.....	63
Figura 17. Determinação da concentração micelar crítica (CMC) em função da tensão superficial (mN/m), utilizando-se diferentes diluições do sobrenadante de cultura contendo o biossurfactante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biossurfactantes e ramos industriais de aplicação.....	16
Tabela 2. Principais tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.	19
Tabela 3. Principais tipos de biossurfactantes produzidos pelo gênero <i>Bacillus</i>	20
Tabela 4. Seleção de cepas de <i>Bacillus</i> produtoras de biossurfactantes.....	41
Tabela 5. Determinação da diluição micelar crítica (DMC) dos sobrenadantes de cultura ao longo da cinética de produção de biossurfactantes por cepas de <i>Bacillus</i>	44
Tabela 6. Produção de biossurfactante por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 por fermentação no estado sólido em diferentes substratos sólidos.....	47
Tabela 7. Produção de biossurfactante por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 por fermentação no estado sólido utilizando Okara e mistura de espuma de poliuretano com Okara.....	47
Tabela 8. Tensão superficial das amostras obtidas após a extração do biossurfactante do meio de cultura.....	49
Tabela 9. Composição de aminoácidos presentes no biossurfactante produzido por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 determinada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).....	51
Tabela 10. Composição da mistura dos homólogos produzidos por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448 em diferentes condições de cultivo.....	54
Tabela 11. Fragmentação dos homólogos da Surfactina A produzida por <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448.....	58
Tabela 12. Pureza do extrato bruto para as diferentes condições de cultivo....	63
Tabela 13. Produção de biossurfactante em diferentes condições de cultivo...	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	Alanina
Allo Thr	Allo Treonina
Asp	Acido Aspártico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
DMC	Diluição micelar crítica
D.O.	Densidade óptica
<i>E</i>	Índice de emulsificação
FES	Fermentação no estado sólido
FS	Fermentação submersa
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
Ile	Isoleucina
LB-Miller	Meio de cultura Luria-Bertani-Miller
Leu	Leucina
MEOR	Recuperação melhorada de petróleo
Orn	Ornitina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pro	Prolina
TI	Tensão interfacial
TS	Tensão superficial
TSA	Meio de cultura ágar soja tripticaseína
Tyr	Tirosina
Val	Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES.....	14
3.2. APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES.....	15
3.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELO GÊNERO <i>Bacillus</i>	17
3.4. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR <i>Bacillus</i> sp.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1. MICRORGANISMOS.....	30
4.1.1. Manutenção das Cepas.....	30
4.2. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS.....	30
4.3. SUBSTRATOS SÓLIDOS.....	30
4.4. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	31
4.4.1. Pré-inóculo.....	31
4.4.2. Meio e Condições de Cultivo para a Fermentação Submersa (FS).....	31
4.4.3. Meio e Condições de Cultivo para a Fermentação no Estado Sólido (FES).....	32
4.5. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	33
4.5.1. Ensaios Preliminares de Produção de Biossurfactantes por <i>Bacillus</i> sp.....	33
4.5.2. Seleção do Microrganismo e da Fonte de Carbono para Produção de Biossurfactante por Fermentação Submersa.....	33
4.5.3. Seleção do Substrato Sólido para Produção de Biossurfactante por Fermentação no Estado Sólido.....	33
4.6. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448.....	34
4.6.1. Processo de Extração do Biossurfactante.....	34
4.6.2. Purificação do Biossurfactante.....	34
4.6.3. Análise Molecular e Estrutural do Biossurfactante.....	35
4.6.3.1. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).....	35

4.6.3.2. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).....	36
4.6.3.3. Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).....	37
4.7. OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS	37
4.7.1. Teste do Espalhamento da Gota.....	37
4.7.2. Determinação da Tensão Superficial (TS).....	38
4.7.3. Determinação da Diluição Micelar Crítica (DMC).....	38
4.7.4. Medida do Índice de Emulsificação (<i>E</i>).....	38
4.7.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	39
4.7.6. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) do Biossurfactante.....	39
4.7.7. Rendimento da Produção de Biossurfactante.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE.....	41
5.1.1. Ensaios Preliminares de Produção de Biossurfactante por <i>Bacillus</i> sp.....	41
5.1.2. Seleção do Microrganismo e da Fonte de Carbono para Produção de Biossurfactante por Fermentação Submersa.....	42
5.1.3. Seleção do Substrato Sólido para Produção de Biossurfactante por Fermentação no Estado Sólido.....	46
5.2. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR <i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448.....	48
5.2.1. Processo de Extração do Biossurfactante.....	49
5.2.2. Purificação do Biossurfactante.....	49
5.2.3. Análise Molecular e Estrutural do Biossurfactante.....	50
5.2.3.1. Determinação dos aminoácidos do biossurfactante por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).....	50
5.2.3.2. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).....	53
5.2.3.3. Elucidação estrutural do biossurfactante por fragmentação dos picos dos homólogos obtidos por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).....	55
5.2.4. Quantificação do Biossurfactante por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência.....	60
5.2.5. Determinação da Concentração Micelar Crítica do Biossurfactante.....	63

5.2.6. Comparação de Produção – Fermentação Submersa e Fermentação no Estado Sólido.....	65
6. CONCLUSÃO.....	66
7. PERSPECTIVAS.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APÊNDICES.....	78

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria deles, disponível comercialmente, é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, associado às novas legislações de controle do meio ambiente, levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002), pois os biossurfactantes são biodegradáveis e não tóxicos (BARROS *et al.*, 2007). Contudo, os processos industriais de produção e aplicação de biossurfactantes ainda precisam ser desenvolvidos. Este desenvolvimento passa pela redução dos custos das matérias-primas e do processo de produção. A chave de sucesso para o desenvolvimento desta tecnologia é a utilização de substratos e processos de baixo custo e o aumento da produção de biossurfactantes altamente ativos, com propriedades específicas para aplicações específicas.

A fermentação no estado sólido (FES), um processo que usa substratos sólidos com baixos conteúdos de água, aparece como uma alternativa viável para produção de biossurfactantes. Esta tecnologia seria de interesse para a produção de lipopeptídeos por *Bacillus* por duas razões: (1) a FES possibilita a utilização de resíduos sólidos abundantes no Brasil como substratos de baixo custo, podendo desta forma reduzir o custo e viabilizar a produção desses tensoativos; (2) o uso da FES evita a formação de espuma durante o processo de fermentação, fator limitante para obtenção desses compostos por fermentação submersa (FS), pois, junto com a espuma, há saída e conseqüente perda de nutrientes, produtos e biomassa, o que reduz a produtividade ou, em casos extremos, inviabiliza a fermentação (CAMILIOS NETO *et al.*, 2008; YEH *et al.*, 2006; LEE e KIM, 2004).

2. OBJETIVOS

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral o estudo da produção de biossurfactantes por cepas do gênero *Bacillus*, utilizando os processos de FS e de FES e a caracterização físico-química, molecular e estrutural dos biossurfactantes produzidos.

Para atingir este objetivo, foram realizadas as seguintes etapas, que compõem os objetivos específicos deste trabalho:

- Selecionar cepas de *Bacillus* produtoras de biossurfactantes;
- Produzir biossurfactantes por fermentação submersa, a partir de meios e condições citados em literatura;
- Extrair e purificar os biossurfactantes produzidos por fermentação submersa, de acordo com técnicas citadas na literatura;
- Caracterizar molecular e estruturalmente os biossurfactantes por técnicas físico-químicas, cromatográficas e espectrométricas;
- Selecionar os substratos com potencial para produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido;
- Estudar a produção de biossurfactantes por fermentação no estado sólido, utilizando os resíduos agroindustriais: bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de mandioca, Okara, palha de arroz e resíduo de milho;
- Extrair, purificar e caracterizar os biossurfactantes produzidos por fermentação no estado sólido;
- Determinar a influência dos meios e condições de cultivo (FS e FES) na composição da mistura de homólogos e nas propriedades físico-químicas do biossurfactante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, com porções hidrofílicas e hidrofóbicas, que reduzem a tensão superficial (TS - força existente entre uma superfície ar-líquido) e a tensão interfacial (TI - força existente entre uma superfície líquido-líquido) (BODOUR e MILLER-MAIER, 1998). Esta propriedade faz com que os surfactantes sejam adequados para um grande número de aplicações industriais, como, por exemplo: detergentes, emulsificantes, lubrificantes, agentes espumantes e agentes umidificadores na solubilização e na dispersão de fases. Devido a isto, surfactantes são utilizados em várias indústrias como têxteis, cosméticas, farmacêuticas, alimentícias, de papel, polímeros e plásticos (KITAMOTO *et al.*, 2002).

A eficácia de um surfactante é determinada por sua habilidade em diminuir a TS, pois este interage com a molécula de água e diminui o trabalho requerido para trazê-la à superfície. Outro parâmetro que determina a eficácia de um surfactante é a concentração micelar crítica (CMC), que é a menor concentração de surfactante na água onde ocorre a formação de micelas. Após este ponto, mesmo com o aumento da concentração de surfactante na solução, a TS permanece constante. A CMC é influenciada pelo pH, temperatura e força iônica (OBERBREMER *et al.*, 1990; SAMSON *et al.*, 1990).

Compostos de origem microbiana que exibem atividade superficial são denominados biossurfactantes, consistindo em subprodutos de seus respectivos sistemas metabólicos. A biodegradabilidade e baixa toxicidade destes compostos constituem vantagens adicionais sobre os correlatos de origem química. Conseqüentemente, podem tornar-se substitutos dos emulsificantes convencionais em alimentos e cosméticos. Apresentam ainda um maior apelo de mercado pelo fato de serem considerados produtos naturais (BARROS *et al.*, 2007; NITSCHKE *et al.*, 2005). Além disso, os biossurfactantes possuem menor CMC ($0,001 - 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (NITSCHKE e PASTORE, 2002) em comparação aos surfactantes sintéticos, como por exemplo, o SDS (dodecil sulfato de sódio), um

dos surfactantes químicos mais comuns, que possui uma CMC de $2,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (TAVARES, 1997).

Nas últimas décadas, diversos microrganismos têm sido relatados como produtores de vários tipos de surfactantes. Embora a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas a eles: (a) emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos; (b) transporte de hidrocarbonetos; (c) aderência-liberação da célula a superfícies; e (d) atividade antibiótica, pois, através da excreção destes compostos, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Bactérias produtoras de biossurfactantes têm sido isoladas do solo, da água marinha, de sedimentos do mar e áreas contaminadas por óleos. Diversas evidências indicam que os biossurfactantes são produzidos em grande quantidade nestes ambientes. Uma delas é a presença de espuma e emulsões em áreas de derramamento de óleos em oceanos (BARROS *et al.*, 2007). Muitos biossurfactantes apresentam ainda alta atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral. Outros apresentam papel relevante na aplicação à saúde, como agentes antiadesivos utilizados no tratamento de diversas doenças, além de serem utilizados como agentes terapêuticos e probióticos (SINGH e CAMEOTRA, 2004).

Dadas as vantagens dos biossurfactantes sobre os surfactantes químicos, torna-se importante destacar algumas aplicações específicas destes compostos.

3.2. APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são produzidos por processos fermentativos, que são mais brandos do que os processos químicos tradicionalmente envolvidos na produção de surfactantes. Além disso, apresentam baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e compatibilidade ambiental. As numerosas vantagens dos biossurfactantes fazem com que suas aplicações sejam recomendadas, não somente na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, mas também na proteção ambiental (KITAMOTO *et al.*, 2002; KARANTH *et al.*, 1999). A Tabela 1

apresenta algumas aplicações sugeridas para os surfactantes produzidos por microrganismos.

Tabela 1. Biossurfactantes e ramos industriais de aplicação

Função do Biossurfactante	Indústria
Recuperação de óleo residual, redução da viscosidade de óleos	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica
Limpeza	Alimentícia, petrolífera, cosmética e química em geral
Solubilização	Alimentícia, cosmética, farmacêutica, papel, plásticos e têxtil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética, petrolífera, plásticos, curtumes, biorremediação e têxtil
Detergente e formadores de espuma	Curtumes, produtos para agricultura, indústria química e metalúrgica
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizadores	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizante	Têxtil
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação e tratamento de resíduos
Removedor de ceras de frutas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto à areia e cascalho	Construção civil

Fonte: SINGH *et al.*, 2007 ; SANTOS, 2001; KOSARIC *et al.*, 1987.

Apesar das inúmeras vantagens relatadas para os biossurfactantes, a sua aplicação em larga escala é ainda limitada, devido ao seu alto custo de produção, sendo, portanto, relatadas em literatura aplicações potenciais. De todas as áreas de aplicação, a que está mais desenvolvida é a ambiental, uma vez que os biossurfactantes aceleram a degradação microbiana de vários óleos, pois aumentam a interação interfacial água-óleo e, assim, promovem a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995).

A recuperação melhorada de petróleo (MEOR) consiste em uma tecnologia de recuperação terciária que utiliza a injeção de um consórcio de bactérias

selecionadas ou de seus metabólicos específicos (dentre eles os biossurfactantes) no reservatório natural (SEN, 2008). A surfactina produzida por *B. subtilis* é um biossurfactante potencial para ser usado na MEOR, visto que Schaller *et al.* (2004) investigaram a mudança de atividade surfactante da surfactina frente a extremas variações de pH, temperatura e força iônica e constataram apenas mudanças discretas na sua atividade. Um consórcio de quatro microrganismos, *Sphingomonas cloacae*, *Rhizobium* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Achromobacter xylosoxidans*, foi capaz de biodegradar fenantreno sólido, utilizando-o como fonte de carbono e energia, o que indica que esse consórcio tem promissora aplicação em MEOR e pode ser potencialmente usado na biorremediação de ambientes contaminados com compostos hidrofóbicos (WANG *et al.*, 2007).

Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos. O ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* é capaz de complexar metais catiônicos como cádmio (Cd^{2+}), chumbo (Pb^{2+}) e zinco (Zn^{2+}) (SANDRIN *et al.*, 2000). Sandrin *et al.* (2000) demonstraram que o ramnolipídeo eliminou a toxicidade do cádmio, quando adicionado em uma concentração 10 vezes superior à concentração do metal.

3.3. PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES PELO GÊNERO *Bacillus*

Diferente dos surfactantes químicos, os quais são classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados principalmente pela sua composição química e sua origem microbiana. Assim, as maiores classes de biossurfactantes incluem: (1) glicolipídeos; (2) lipopolissacarídeos; (3) lipopeptídeos e lipoproteínas; (4) fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros; (5) surfactantes poliméricos e (6) surfactantes particulados (DESAI e BANAT, 1997; ZAJIC e SEFENS, 1984). Alguns exemplos de biossurfactantes e suas classes são mostrados na Figura 1.

Uma grande variedade de microrganismos pode produzir biossurfactantes, sendo os mais conhecidos apresentados na Tabela 2.

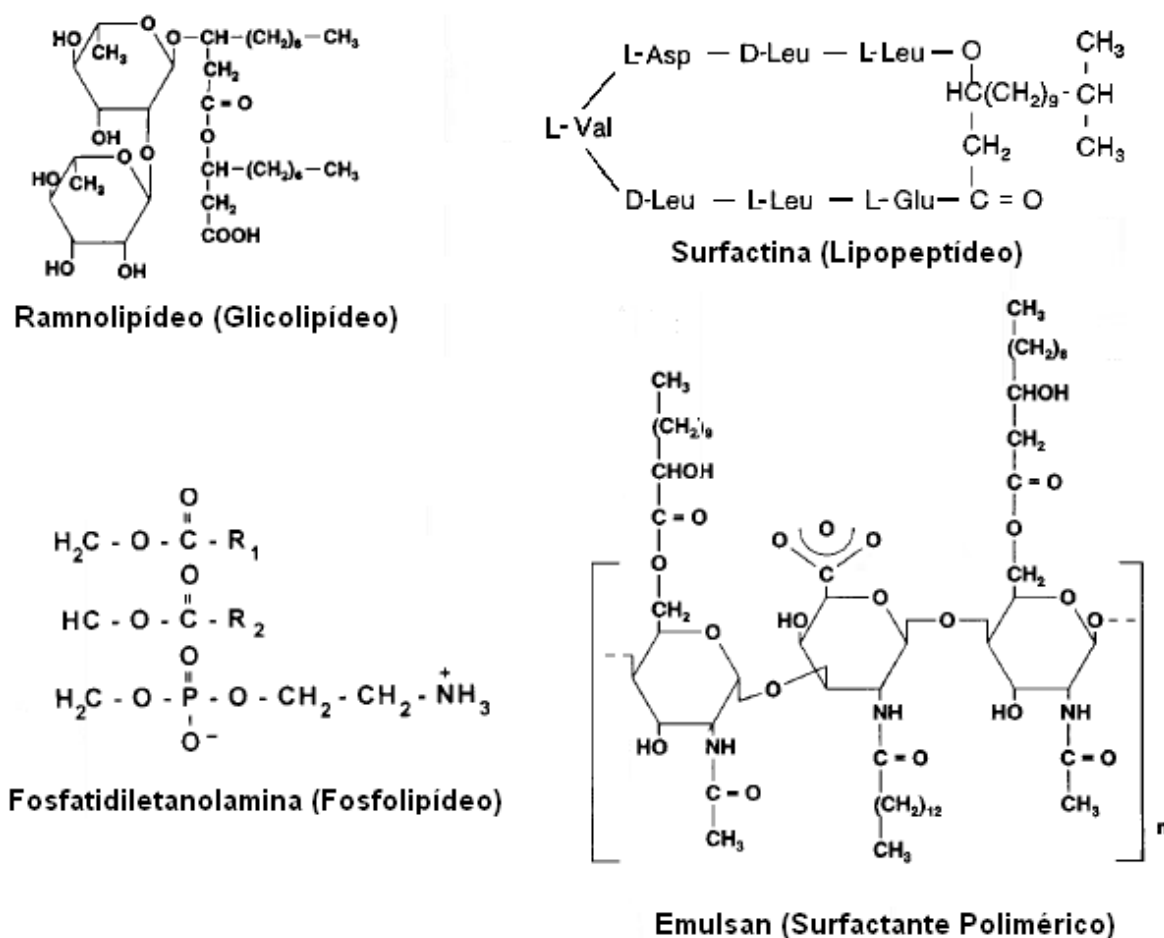


Figura 1. Estrutura química de alguns tipos de biossurfactantes. Fonte: DESAI e BANAT, 1997.

É importante salientar que biossurfactantes são produzidos geralmente na forma de uma mistura de homólogos, cuja composição depende da cepa utilizada, das condições e da idade da cultura. Assim como a sua composição pode variar, as propriedades físico-químicas dos biossurfactantes também são bastante variáveis e dependem diretamente da composição da mistura de homólogos (KRIEGER *et al.*, 2009).

Dentre a gama de biossurfactantes e microrganismos produtores, apenas a produção de lipopeptídeos por *Bacillus* será abordada, uma vez que estes são os biossurfactantes estudados neste trabalho. Cepas do gênero *Bacillus* normalmente produzem lipopeptídeos, mas isto nem sempre é o caso, como o relatado para *Bacillus megaterium*, que produz um glicolipídeo (Tabela 3). A Tabela 3 traz os principais tipos de biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus* e, em seguida, serão descritos os mais comumente produzidos.

Tabela 2. Principais tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos

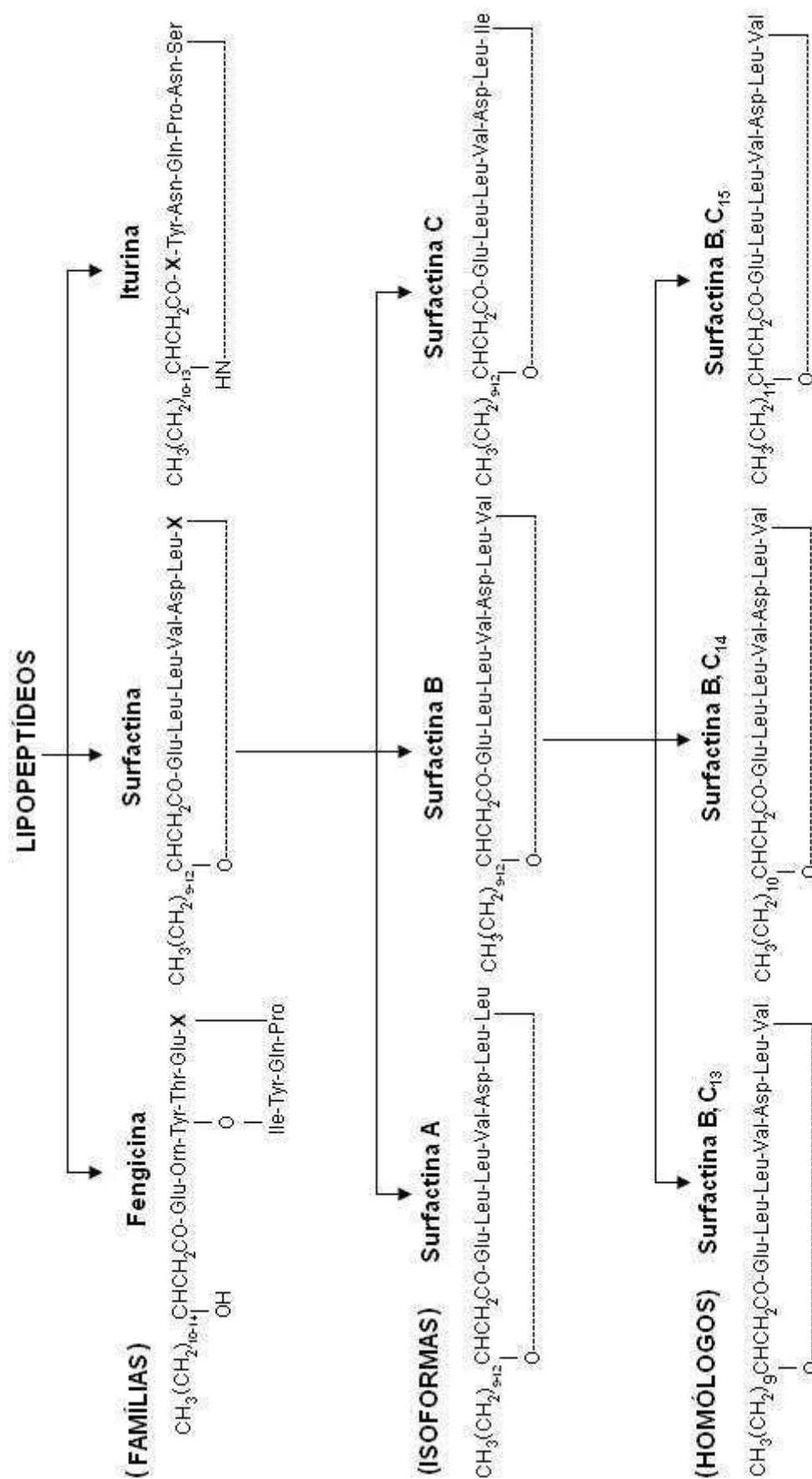
Tipo de biossurfactante	Microrganismos	Referências
Glicolipídeos		
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas</i> sp.; <i>P. aeruginosa</i>	GEORGIOU <i>et al.</i> 1992
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>T. apicola</i> ; <i>T. petrophilum</i> ; <i>Candida lipolytica</i> ; <i>C. bombicola</i>	MUKHERJEE <i>et al.</i> , 2006 ; DESAI e BANAT, 1997; GEORGIOU <i>et al.</i> , 1992
Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Arthrobacter</i> sp.; <i>Nocardia corynebacteroides</i> ; <i>Mycobacterium</i> sp.	DESAI e BANAT, 1997; GEORGIOU <i>et al.</i> , 1992
Lipopeptídeos e lipoproteínas		
Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>	DEXTER <i>et al.</i> , 2008
Gramicidina	<i>B. brevis</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Iturina	<i>B. subtilis</i>	DEXTER <i>et al.</i> , 2008
Liquenissina	<i>B. licheniformis</i>	DEXTER <i>et al.</i> , 2008
Polimixina	<i>B. polymyxa</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Serravetina	<i>Serratia marcescens</i>	GEORGIOU <i>et al.</i> , 1992
Surfactina	<i>B. subtilis</i>	GEORGIOU <i>et al.</i> , 1992
Surfactina	<i>B. pumilus</i>	MORIKAWA <i>et al.</i> , 1992
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>	GEORGIOU <i>et al.</i> , 1992
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos		
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>	GEORGIOU <i>et al.</i> , 1992
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> ; <i>Acinetobacter</i> sp.; <i>Aspergillus</i> spp.; <i>Rhodococcus erythropolis</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>	GEORGIOU <i>et al.</i> , 1992
Surfactantes poliméricos		
Alasan	<i>A. radioresistens</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Carboidrato-proteína-lipídeo	<i>P. fluorescens</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Liposan	<i>C. lipolytica</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Manana-lipídeo-proteína	<i>C. tropicalis</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Manoproteína	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Proteína PA	<i>P. aeruginosa</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Surfactantes particulados		
Células	Várias bactérias	DESAI <i>et al.</i> , 1997
Vesículas	<i>A. calcoaceticus</i>	DESAI <i>et al.</i> , 1997

Tabela 3. Principais tipos de biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus*

Tipo de biossurfactante	Microrganismo	Referências
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>	SUZUKI <i>et al.</i> , 1965
Surfactina	<i>B. subtilis</i>	ARIMA <i>et al.</i> , 1968
Subtilisina	<i>B. subtilis</i>	BERNHEIMER <i>et al.</i> , 1970
Cerexina	<i>B. cereus</i>	SHOJI <i>et al.</i> , 1975
Gramicidina	<i>B. brevis</i>	MARAHIEL <i>et al.</i> , 1979
Liquenisina	<i>B. licheniformis</i>	JAVAHERI <i>et al.</i> , 1985
Fengicina	<i>B. subtilis</i>	VANITTANAKOM <i>et al.</i> , 1986
Surfactina	<i>B. pumilus</i>	MORIKAWA <i>et al.</i> , 1992
Surfactina	<i>B. coagulans</i>	HUSZCZA <i>et al.</i> , 2003
Ramnolipídeo	<i>B. subtilis</i>	CHRISTOVA <i>et al.</i> , 2004
Surfactina	<i>B. atrophaeus</i>	NEVES <i>et al.</i> , 2007
Bamilocina	<i>B. amyloliquefaciens</i>	LEE <i>et al.</i> , 2007
Lipopeptídeo	<i>B. circulans</i>	DAS <i>et al.</i> , 2008
Glicolipídeo	<i>B. megaterium</i>	THAVASI <i>et al.</i> , 2008

Os lipopeptídeos excretados por *B. subtilis* podem ser divididos em três famílias compostas por peptídeos cíclicos com diferentes estruturas: surfactina, iturina (iturinas, micosubtilisinas e bacilomicinas) e fengicina. Estas famílias subdividem-se em isoformas, que diferem na composição dos aminoácidos. As isoformas podem ainda apresentar uma subdivisão em séries homólogas, que variam no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica (ONGENA *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2007; VATER *et al.*, 2002; DELEU *et al.*, 1999). Estas divisões estão exemplificadas na Figura 2.

A surfactina é um dos biossurfactantes mais eficientes conhecidos, pois em concentrações menores que $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ é capaz de reduzir a tensão superficial (TS) da água de 72 para $27 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (WEI *et al.*, 2003; FOX e BALA, 2000) e a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN/m (BARROS *et al.*, 2007). Além de propriedades surfactantes poderosas, a surfactina exibe uma excelente estabilidade em variações de pH, temperatura e força iônica e apresenta atividade hemolítica (DESAI e BANAT, 1997). Estas propriedades interessantes promoveram o interesse em pesquisas com a surfactina. Como resultado, uma variedade de isoformas e homólogos da surfactina foram encontrados, conforme descrito a seguir.



A surfactina é um heptapeptídeo cuja porção lipídica é comumente composta pelos tipos *n*, *iso* e *anteiso*, que podem variar de 12 a 16 átomos de carbono. O componente principal deste biossurfactante é o ácido 3-hidróxi-13-metil-tetradecanóico (LIU *et al.*, 2008; KLUGE *et al.*, 1988). A principal isoforma possui a sequência de resíduos de aminoácidos N—L-Glu—L-Leu—D-Leu—L-Val—L-Asp—D-Leu—L-Leu—C e é denominada Surfactina A. As isoformas variam na posição do sétimo aminoácido (Figura 3), entre Leu (Surfactina A), Val (Surfactina B) e Ile (Surfactina C), fator este que depende da linhagem e das condições ambientais e nutricionais em que o biossurfactante foi produzido (LIU *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2007; VATER *et al.*, 2002).

Por outro lado, Ahimou *et al.*, (2000), em um estudo com sete cepas de *B. subtilis*, mostraram, por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) dos sobrenadantes de cultura, que, das três famílias de lipopeptídeos que *Bacillus* sp. produz, somente a Iturina A (Figura 4A) foi produzida pelas cepas estudadas. Os compostos de iturina também são lipo-heptapeptídeos, mas com sequência peptídica diferente da surfactina. Esses compostos apresentam os resíduos de aminoácidos distribuídos na sequência quiral LDDLLDL e um ácido graxo β -amino como componente lipofílico. Suas cadeias carbônicas podem variar de 13 a 17 átomos de carbono, apresentando ainda atividade antibiótica e antifúngica (ROMERO *et al.*, 2007; ONGENA *et al.*, 2007; VATER *et al.*, 2002). Os compostos de iturina apresentam 6 isoformas predominantes, as Iturinas A e B (Figura 4), a Micosubtilisina e as Bacilomicinas D, F e L.

Já a fengicina consiste de duas principais isoformas que diferem pela troca de um aminoácido. A Fengicina A (Figura 5A) é composta por L-Glu—D-Orn—D-Tyr—D-*allo*-Thr—L-Glu—D-Ala—L-Pro—L-Gln—L-Tyr—L-Ile, visto que na Fengicina B (Figura 5B), o resíduo de aminoácido D-Ala é substituído por D-Val. Em ambas as isoformas, há uma ligação lactona conectando D-Tyr e L-Ile, cuja estrutura é composta por um ácido graxo β -hidróxi ligado a uma porção peptídica de 10 aminoácidos, incluindo 8 em ciclo. Esse ácido graxo pode variar de 13 a 18 átomos de carbono, distribuídos nas formas *n*, *iso*, *anteiso*, podendo ser saturado ou insaturado. A fengicina apresenta forte atividade surfactante e antifúngica, mas é ineficaz frente a bactérias e leveduras (ONGENA *et al.*, 2007; ROMERO *et al.*, 2007; VATER *et al.*, 2002; VANITTANAKOM *et al.*, 1986).

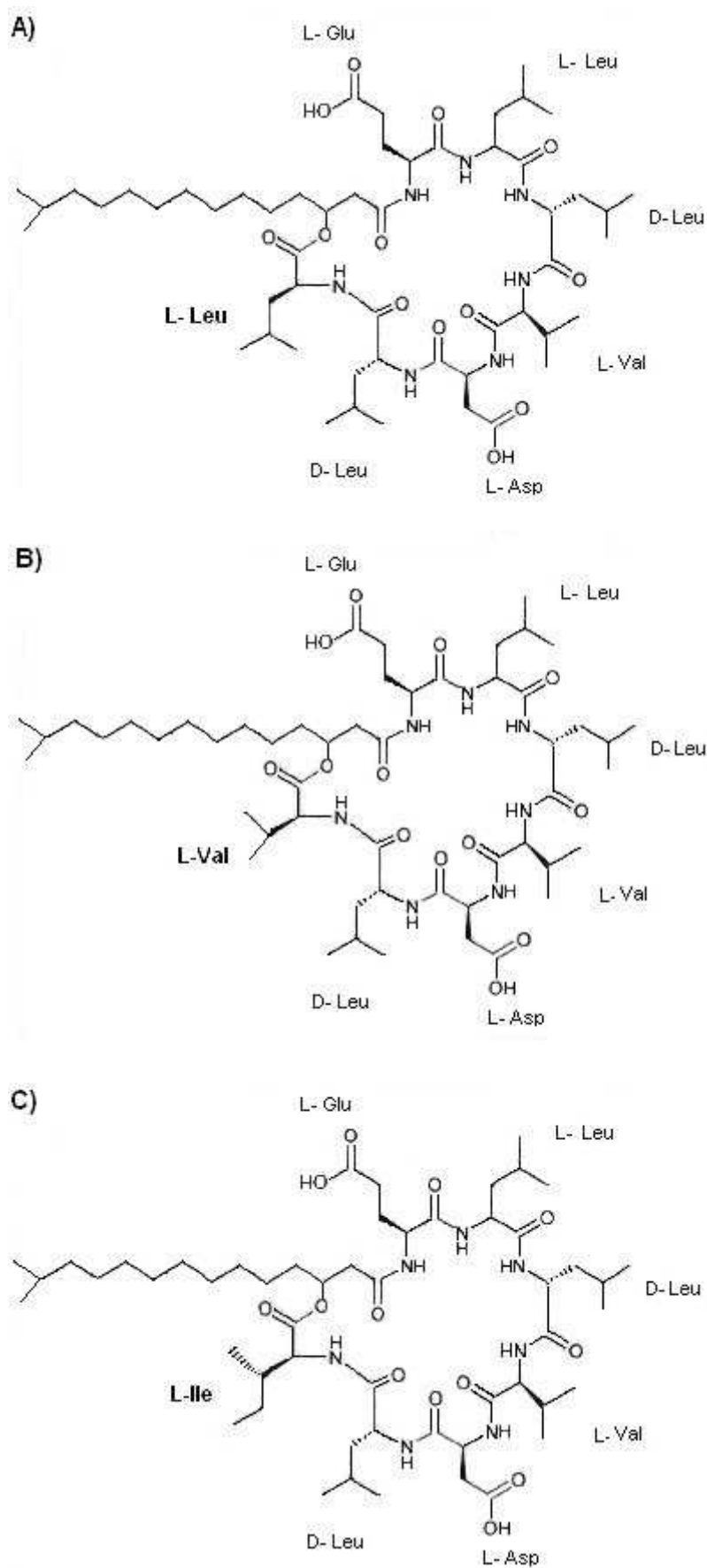


Figura 3. Estrutura do principal homólogo (*iso-C₁₅*) da surfactina. Isoformas: **(A)** Surfactina A, **(B)** Surfactina B e **(C)** Surfactina C. Fonte: VATER *et al.*, 2002.

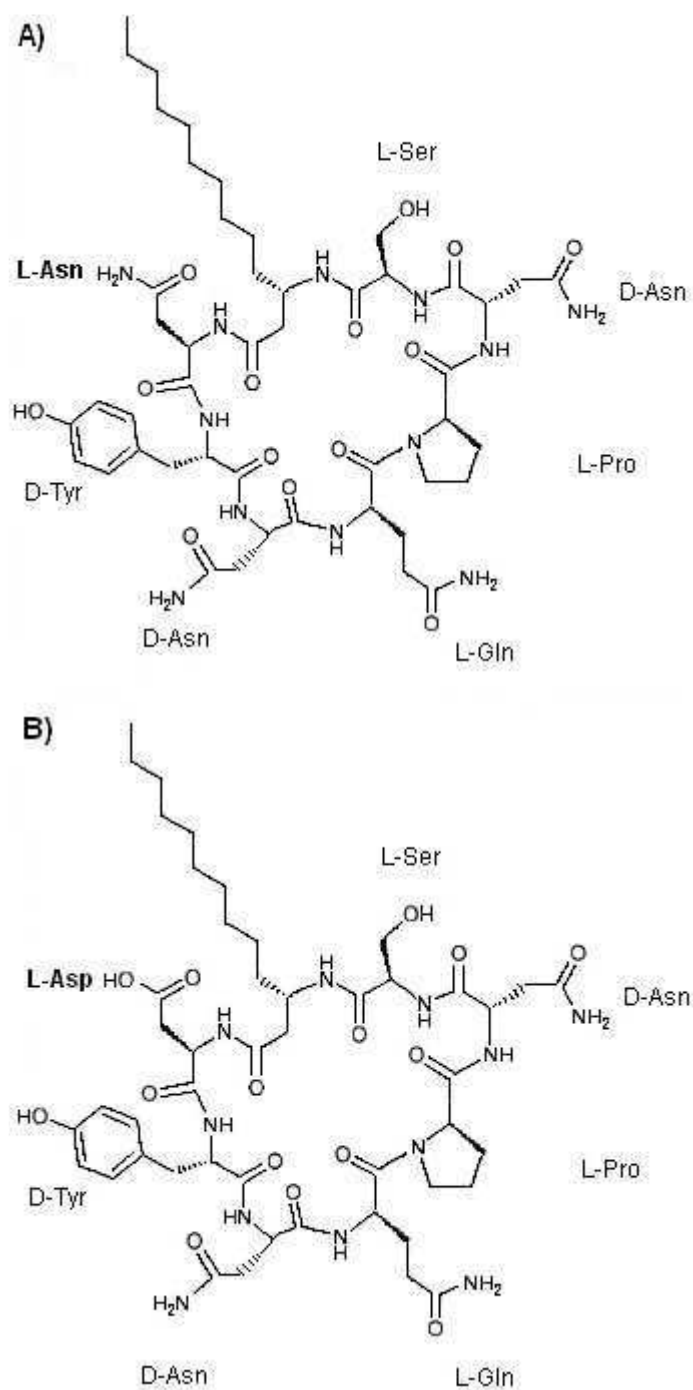


Figura 4. Estrutura do principal homólogo (n-C₁₃) da iturina. Isoformas: **(A)** Iturina A e **(B)** Iturina B. Fonte: VATER *et al.*, 2002.

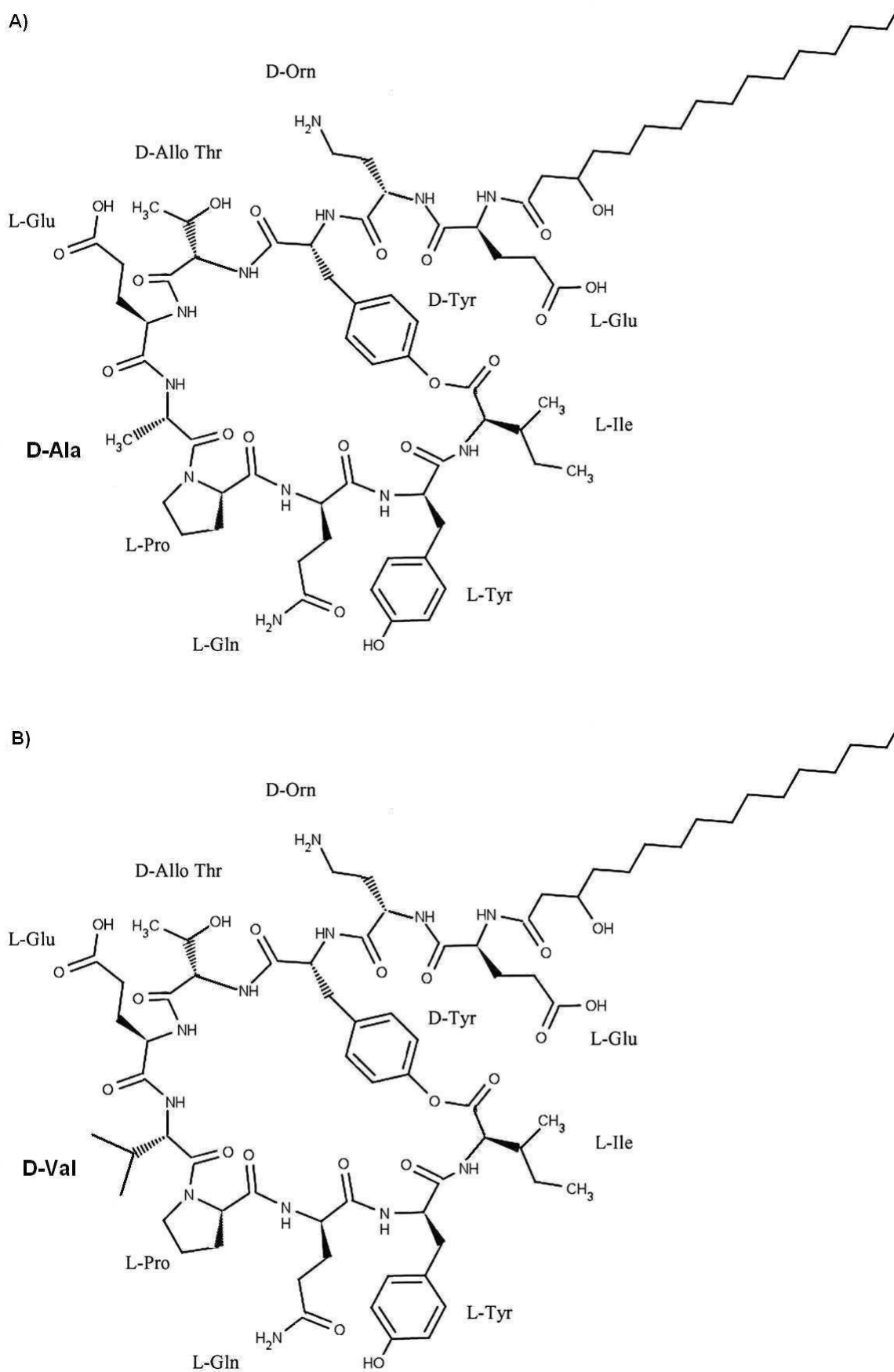


Figura 5. Estrutura do homólogo n -C₁₆ da fengicina. Isoformas: **(A)** Fengicina A e **(B)** Fengicina B. Fonte: VATER *et al.*, 2002.

B. licheniformis, sob circunstâncias aeróbicas e anaeróbicas, na presença de elevada salinidade e temperatura, produz um lipopeptídeo com atividade surfactante (lichenisina) com excelentes propriedades interfaciais (FOLMSBEE *et al.*, 2006; BATRAKOV *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 1998). A produção deste biossurfactante ocorre durante a fase exponencial de crescimento das células tanto aeróbica quanto anaerobicamente (MOHAMMAD *et al.*, 1985). Assim como a surfactina, a lichenisina é constituída por um heptapeptídeo com a sequência quiral LLDLLDL ligado a um ácido graxo, por uma ligação β -hidróxi, contendo de 12 a 16 átomos de carbono com a configuração em *n*, *iso* e *anteiso*. Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos estão localizados nas posições 2, 3, 4, 6 e 7 da sequência peptídica, enquanto um resíduo de aspartato está na posição 5. A lichenisina difere da surfactina pela presença de um resíduo de glutamina no lugar do glutamato na posição 1 da sequência peptídica. Poucos biossurfactantes de *B. licheniformis* têm sido caracterizados em detalhes, dos quais a Lichenisina A (Figura 6) é a melhor estudada, sendo as outras isoformas variantes da surfactina (JOSHI *et al.*, 2008; YAKIMOV *et al.*, 1999).

Li *et al.* (2008), encontraram e identificaram nove diferentes lipopeptídeos homólogos e isoformas em culturas de *B. licheniformis*. O microrganismo produziu quatro homólogos da Surfactina A, com 13, 14, 15 e 16 átomos de carbonos na cadeia do ácido graxo e cinco homólogos da Lichenisina A, com 12, 13, 14, 15 e 16 átomos de carbonos.

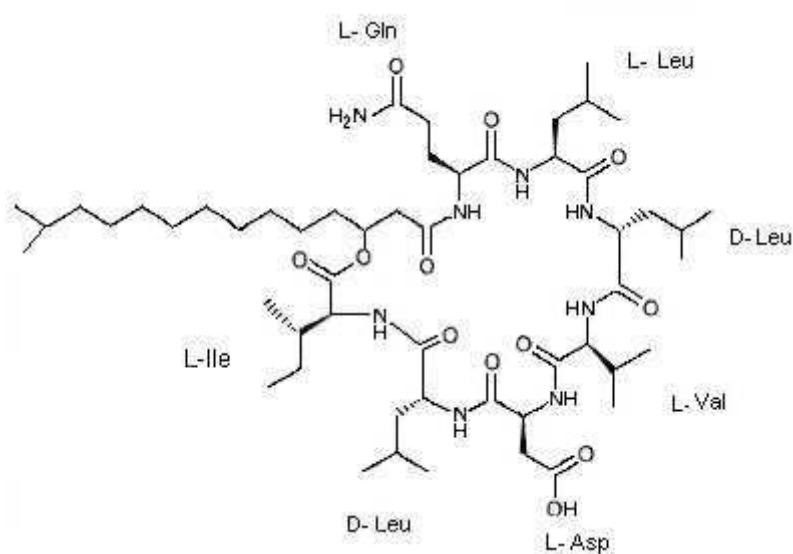


Figura 6. Lichenisina A: estrutura de uma isoforma da lichenisina e homólogo (*iso*-C₁₅). Fonte: VATER *et al.*, 2002.

Existem poucos artigos na literatura sobre a produção de biossurfactantes por *B. pumilus*, o microrganismo estudado no presente trabalho. Os primeiros estudos foram reportados por Morikawa *et al.* (1992), que identificaram *B. pumilus* como um novo produtor de surfactina. Por outro lado, Hsieh *et al.* (2004), testaram a produção de surfactina por diversas espécies de *Bacillus* e concluíram que o biossurfactante produzido por *B. pumilus* é similar, mas não idêntico, à surfactina. Neste mesmo trabalho, os ensaios de detecção de uma região específica do gene da surfactina sintetase (enzima indispensável para síntese de surfactina), pela reação em cadeia da polimerase (PCR), também foram negativos para esta espécie de *Bacillus*. Calvo *et al.* (2004), estudaram o crescimento de *B. pumilus* 28-11 na presença de petróleo e naftaleno sob condições aeróbias e perceberam a utilização destas substâncias como fonte de carbono e energia pelo microrganismo. Estes resultados revelaram que *B. pumilus*, ou o biossurfactante por ele produzido, podem ter aplicação na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos do petróleo.

3.4. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Bacillus* sp.

As técnicas biotecnológicas para produção de metabólitos de microrganismos (entre os quais, os biossurfactantes) relatadas na literatura são, basicamente, a fermentação submersa (FS) e a fermentação no estado sólido (FES). Estas duas técnicas diferem, sobretudo, no teor de água contido nos meios de cultivo. Enquanto na FS a água é o solvente e os substratos estão dissolvidos no meio, a FES utiliza substratos sólidos, nos quais a água é um dos componentes e está presente em teores que variam de 30 a 70% (MITCHELL *et al.*, 2006).

Mais especificamente, a FES é definida como o processo fermentativo que envolve substratos sólidos com limitação de água livre nos espaços intersticiais. Entretanto, o substrato deve ter umidade suficiente para comportar o crescimento e o metabolismo do microrganismo (MITCHELL *et al.*, 2006). A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de algumas enzimas específicas, que não seriam produzidas na FS, além da FES proporcionar uma maior produtividade volumétrica e um maior rendimento (MITCHELL *et al.*, 1992; MOO-YOUNG *et al.*,

1983). Especificamente na produção de biossurfactantes, a FES apresenta as vantagens de evitar o problema de formação de espuma (*foaming*) (KRIEGER *et al.*, 2009; VEENANADIG *et al.*, 2000) e utilizar resíduos agroindustriais como substratos de fermentação, diminuindo assim os custos de produção (MITCHELL *et al.*, 2006; MITCHELL *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2000).

A produção de biossurfactantes, tanto em escala de bancada como em processos industriais, tem sido realizada principalmente por fermentação submersa (FS), como é o caso do lipopeptídeo surfactina produzido pela Sigma-Aldrich, empregando *B. subtilis* (KRIEGER *et al.*, 2009). A produção de biossurfactantes no meio de cultura, quando se usa a FS, é geralmente seguida qualitativamente pela determinação da tensão superficial (TS) do sobrenadante de cultivo e, quantitativamente, por determinação de açúcares no meio (para ramnolipídeos) ou, ainda, por técnicas cromatográficas como a CLAE para a análise de lipopeptídeos (SANTOS, 2001).

Existem alguns estudos sobre a otimização dos meios líquidos e condições de cultura para obtenção biossurfactantes produzidos por cepas do gênero *Bacillus*, mas nenhum trabalho foi relatado para *B. pumilus*. Al-Ajlani *et al.* (2007), otimizando a produção de surfactina, obtiveram um rendimento de $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando sacarose como fonte de carbono e adicionando ferro ao meio de cultivo. Já Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) estudaram a produtividade de *B. subtilis* usando melaço como fonte de carbono e obtiveram um rendimento de $1,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Foi estudado ainda o efeito de elementos-traço para produção da surfactina por *B. subtilis*, obtendo-se um rendimento de $3,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com a adição de $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de Mg^{+2} e 10 mmol/L de K^{+} (WEI *et al.*, 2007). A mais alta produção de surfactina relatada na literatura para FS é de $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, produzida por uma cepa mutante de *B. subtilis* que foi cultivada em extrato aquoso de farinha de soja (YONEDA *et al.*, 2006).

Poucos estudos estão relatados para a produção de biossurfactantes por FES. Dentre eles, Ohno *et al.* (1995), estudaram a produção de biossurfactantes utilizando como substrato o resíduo fermentado de soja ("Okara") para linhagens *B. subtilis* geneticamente modificadas, que produziram a surfactina, na quantidade de $2,0 \text{ g}\cdot\text{kgSS}^{-1}$ (grama por kilograma de substrato seco). Veenanadig *et al.* (2000) estudaram a produção de biossurfactante por *B. subtilis* FE-2 em biorreator de FES utilizando farelo de trigo como substrato e conseguiram um abaixamento

máximo da TS com 54 h de fermentação, porém não chegaram a dosar a quantidade de biossurfactante produzido.

Mais recentemente, Das e Mukherjee (2007) compararam a produção de biossurfactante por duas cepas de *B. subtilis* por FS e FES, utilizando cascas de batata como substrato. A quantidade de biossurfactante produzido foi similar em ambos os sistemas, com produções de 102 e 92 g·kgSS⁻¹ na FS e FES, respectivamente.

Para estudos da produção de ramnolipídeos por FES, Camilios Neto *et al.* (2008) relataram a otimização da produção por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Neste caso, utilizou-se uma mistura de substratos composta por 50% de bagaço de cana-de-açúcar e 50% de farinha de semente de girassol, obtendo-se, após 288 h de cultivo, uma produção de 172 g·kgSS⁻¹.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram as seguintes cepas do gênero *Bacillus* isoladas de resíduos de cana-de-açúcar, gentilmente cedidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal do Pernambuco: *Bacillus* sp. (espécie ainda não identificada) UFPEDA 447, *B. pumilus* UFPEDA 448 e *B. subtilis* UFPEDA 456.

4.1.1. Manutenção das Cepas

Para a manutenção, realizada mensalmente, as cepas de *Bacillus* foram inicialmente transferidas dos tubos de ensaio, nos quais vieram de Pernambuco, para placas de Petri descartáveis e esterilizadas contendo 10 mL de meio ágar soja tripticaseína (TSA) ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Essa transferência foi feita com o auxílio de uma alça de platina devidamente esterilizada, onde as bactérias de uma determinada espécie são espalhadas no TSA já endurecido. As placas foram levadas para estufa a 37°C por cerca de 24 h e depois armazenadas a 4°C .

4.2. ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS

Para garantir as condições estéreis os meios líquidos, os substratos sólidos e os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm, durante 15 min, antes do início de qualquer procedimento.

4.3. SUBSTRATOS SÓLIDOS

Foram utilizados os seguintes substratos sólidos para a FES:

a) Bagaço de cana-de-açúcar: resíduo da extração do caldo da cana-de-açúcar para fabricação de álcool etílico e açúcar, foi cedido pela Usina de Álcool Melhoramentos (Jussara – PR).

- b) Bagaço de mandioca: subproduto da obtenção do polvilho, cedido pela empresa Corn Products Brasil (Jundiaí – SP).
- c) Espuma de poliuretano comercial: densidade de 33 Kg/m³, cortada em cubos de 0,5 cm³, adquirida no Rei das Espumas (Curitiba – PR).
- d) Farelo de milho: subproduto da extração do óleo de milho, cedido pela empresa Corn Products Brasil (Jundiaí – SP).
- e) Palha de arroz: cedida pela empresa Arroz Frias (Apucarana – PR).
- f) Okara: este resíduo foi cedido pela Cocamar (Maringá – PR). Foi seco em estufa a 60°C, durante três dias e depois moído em moinho de rotor tipo Ciclone, modelo TE - 65112, obtendo-se uma farinha (granulometria < 0,5 mm ou 32 mesh). Este é um resíduo sólido da extração aquosa da soja (extrato hidrossolúvel) resultante do processo de filtração que separa o extrato aquoso. Da desidratação de 1 kg deste subproduto, são obtidos aproximadamente 250 g de Okara seco (farinha) (BOWLES e DEMIATE, 2006).

Os substratos sólidos foram pesados e autoclavados, sem passar por nenhum processo de lavagem para sua utilização.

4.4. MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.4.1. Pré-inóculo

As cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio Luria-Bertani-Miller (LB-Miller) [1% (m/v) triptona, 1% (m/v) NaCl e 0,5% (m/v) extrato de levedura]. Os pré-cultivos foram preparados através da transferência, com alça de platina, de colônias isoladas a partir de placas de Petri com meio sólido TSA e incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da densidade óptica do meio de cultivo a 600 nm (D.O._{600nm}). Este cultivo foi utilizado como inóculo quando a D.O._{600nm} encontrava-se entre 0,6 e 0,8 (DAS e MUKHERJEE, 2007).

4.4.2. Meio e Condições de Cultivo para a Fermentação Submersa (FS)

Frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio composto de

glucose ou glicerol ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e sais $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 (0,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{Na}_2\text{HPO}_4 (5,67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{KH}_2\text{PO}_4 (4,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (0,001 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0,197 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} (0,002 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}) \text{ e } \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0,015 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1})]$ foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo preparado como descrito acima. As fermentações foram mantidas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm (VATER *et al.*, 2002). Os cultivos foram interrompidos em tempo oportuno e centrifugados a $12500\cdot\text{g}$ por 10 min para eliminação das células do meio.

4.4.3. Meio e Condições de Cultivo para a Fermentação no Estado Sólido (FES)

Os ensaios de FES foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 g dos seguintes substratos sólidos: bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, farelo de milho, bagaço de mandioca e Okara, e espuma de poliuretano (neste caso, 2 g). Também foram utilizadas misturas de Okara com espuma de poliuretano, na proporção de 9:1 (m/m), nas proporções de 2,5:7,5, 5:5, 7,5:2,5 (m/m). Estes substratos foram umedecidos com quantidades diferenciadas de uma solução umedecedora constituída de glicerol ou glucose ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e sais $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 (0,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{Na}_2\text{HPO}_4 (5,67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{KH}_2\text{PO}_4 (4,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} (0,001 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0,197 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}), \text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} (0,002 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}) \text{ e } \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0,015 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1})]$. A solução umedecedora e os substratos sólidos foram esterilizados separadamente.

Os substratos foram umedecidos com a solução umedecedora contendo o pré-inóculo [4% (v/v), item 4.4.1] até atingir a máxima capacidade de absorção, analisada visualmente, sendo esta expressa em volume de solução umedecedora por massa de substrato sólido seco: bagaço de cana ($5 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), palha de arroz ($1,5 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), espuma de poliuretano ($8,5 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), farelo de milho ($2 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), bagaço de mandioca ($5 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$), Okara ($2,3 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$) e misturas de substratos (volumes de solução proporcionais a cada substrato). Os frascos foram incubados, de 12 a 60 h, em estufa a 37°C . Aos cultivos interrompidos foram adicionados 100 mL de água destilada e os frascos foram levados ao agitador orbital por 1 h, a 37°C e 200 rpm. Em seguida, foi feita a filtração em gaze para retirada do substrato. O sólido foi prensado manualmente para extração do líquido. O filtrado foi centrifugado a $12500\cdot\text{g}$ por 10 min para obter o extrato livre de células (CAMILIOS NETO *et al.*, 2008).

4.5. ESTUDO DA PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

4.5.1. Ensaios Preliminares de Produção de Biossurfactantes por *Bacillus* sp.

Estes ensaios seguiram procedimentos que envolveram cultivos de 72 h por FS (item 4.4.2) e por FES (item 4.4.3). A glucose foi utilizada como única fonte de carbono exógena, tanto em FS como em FES. No caso da FES, o substrato utilizado foi o bagaço de cana-de-açúcar. A produção de biossurfactantes para as cepas de *Bacillus* sp. foi avaliada pelo método do espalhamento da gota (item 4.7.1) e por medida da TS (item 4.7.2) do sobrenadante de cultivo da FS e do extrato aquoso da FES. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (MONTEIRO, 2007).

4.5.2. Seleção do Microrganismo e da Fonte de Carbono para Produção de Biossurfactante por Fermentação Submersa

A melhor produção de biossurfactante, para as cepas que produziram os melhores resultados nos ensaios preliminares (*B. pumilus* UFPEDA 448 e *B. subtilis* UFPEDA 456), foi avaliada por FS (item 4.4.2) variando a fonte de carbono (glucose e glicerol). Amostras foram coletadas a cada 12 h até 60 h de fermentação. Os sobrenadantes de cultivo foram submetidos à determinação da TS (item 4.7.2) e da diluição micelar crítica (DMC, item 4.7.3). Os índices de emulsificação (*E*) (item 4.7.4) foram determinados com os sobrenadantes de cultura livres de células nas melhores condições de produção para cada cepa.

4.5.3. Seleção do Substrato Sólido para Produção de Biossurfactante por Fermentação no Estado Sólido

A FES foi realizada com a cepa de *B. pumilus* UFPEDA 448, utilizando glicerol como fonte de carbono exógena. As fermentações foram feitas com os 6 substratos sólidos e com as misturas descritas no item 4.4.3 e foram seguidas por 60 h, com coletas a cada 12 h (item 4.4.3). Os extratos aquosos foram submetidos à determinação da TS (item 4.7.2) e DMC (item 4.7.3) (JOSHI *et al.*, 2008). Depois de selecionado o melhor substrato para FES, este foi utilizado em

uma proporção de 5% (m/v) em FS (item 4.4.2), para produção de biossurfactante e posterior análise estrutural da mistura de homólogos.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448

4.6.1. Processo de Extração do Biossurfactante

O pH do sobrenadante de cultivo da FS de 48 h produzido por *B. pumilus* UFPEDA 448 (item 4.4.2) foi ajustado para 2,0 (HCl 6 mol·L⁻¹). O sobrenadante acidificado foi mantido a 4°C por 12 h para a precipitação do biossurfactante. O precipitado foi separado por centrifugação a 12500·g por 10 min, solubilizado em 10 mL de água destilada e seu pH foi ajustado para 7,0, com uma solução de NaOH 1 mol·L⁻¹ (GHOJAVAND *et al.*, 2008). A solução resultante foi submetida à extração com CHCl₃:CH₃OH (4:1). O solvente da fase orgânica foi evaporado a 40°C em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, obtendo-se a fração residual, denominada extrato bruto (Figura 7). Ao final, tanto o sobrenadante 2 como a fase aquosa e o extrato bruto solubilizado em água destilada (Figura 7) foram submetidos à determinação da TS (item 4.7.2).

4.6.2. Purificação do Biossurfactante

Depois das análises realizadas nos extratos brutos, foi feita a cromatografia em camada delgada (CCD) analítica e preparativa (item 4.7.5). As bandas da CCD preparativa foram raspadas da placa, coletadas em erlenmeyers e lavadas com uma mistura de CHCl₃:CH₃OH (4:1). O solvente da fase orgânica foi evaporado a uma temperatura de 40°C em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Os compostos secos obtidos das bandas foram solubilizados em água para determinação da TS (item 4.7.2). Os compostos que reduziram a TS foram analisados em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM) (item 4.6.3.1).

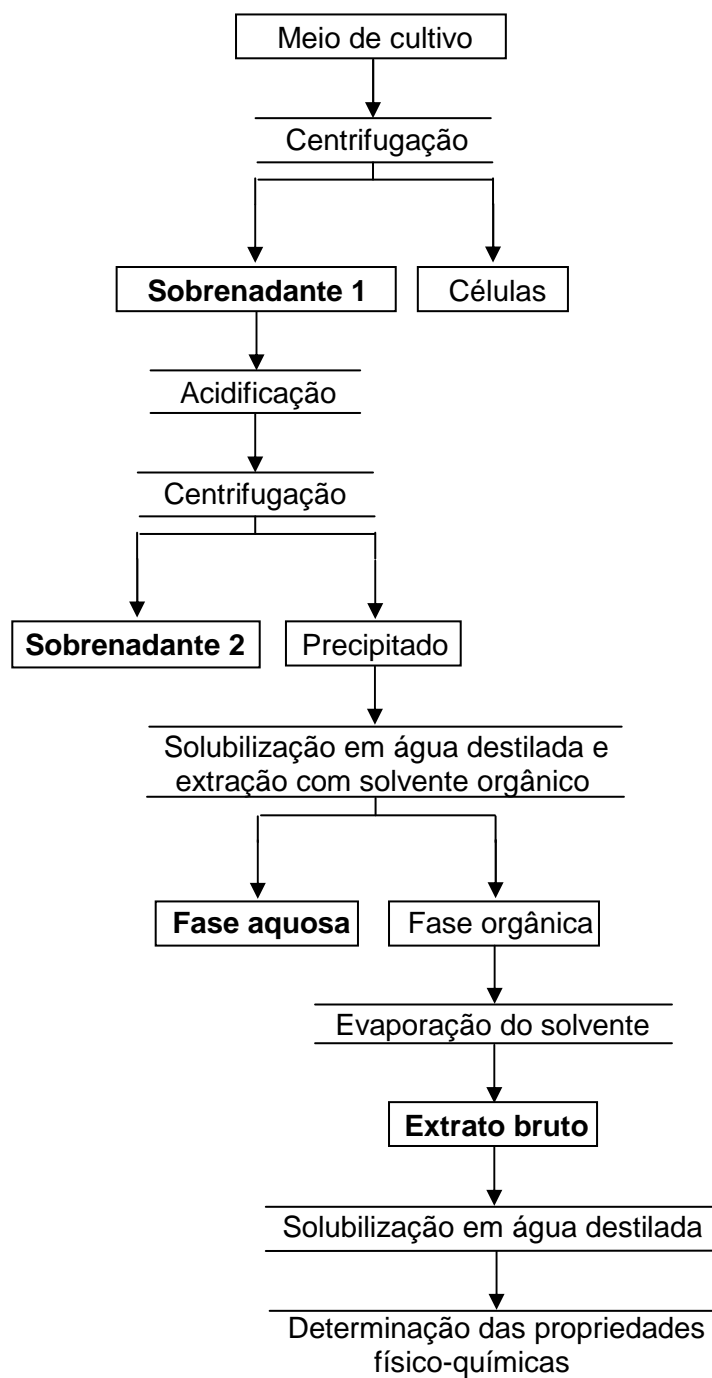


Figura 7. Processo de extração do biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448

4.6.3. Análise Molecular e Estrutural do Biossurfactante

4.6.3.1. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Esta técnica foi utilizada para analisar os aminoácidos presentes no biossurfactante produzido.

Os compostos que reduziram a TS, obtidos da(s) banda(s) da CCD preparativa (item 4.6.2), foram previamente hidrolisados com HCl 6 mol·L⁻¹ por cerca de 18 h a 100°C. Após a hidrólise, o ácido clorídrico foi evaporado sob fluxo de N₂. Foi feita então a esterificação dos ácidos graxos, acrescentando 300 µL de CH₃OH:HCl e aquecendo a 100°C por 30 min. Em seguida, foi feita a acetilação, acrescentando-se 100 µL de piridina e 400 µL de anidrido acético e aquecendo a 100°C por 1 h (SASSAKI *et al.*, 2008).

Depois dos compostos terem sido convertidos em seus derivados voláteis (ésteres metílicos de aminoácidos acetilados), estes foram analisados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) em equipamento Varian Saturn 2000R (*íon trap detector*). A coluna utilizada na separação dos componentes foi uma coluna capilar CP-Sil-5CB (30 m x 0,25 mm). O gás de arraste utilizado foi He (5.0 analítico) a um fluxo de 1 mL/min e a temperatura do injetor foi de 250°C. A temperatura inicial do cromatógrafo foi de 50°C e foi mantida por 2 min, aumentada para 90°C, em uma taxa de 20°C·min⁻¹, mantida por 1 min, e então aumentada para 280°C em uma taxa de 5°C·min⁻¹, e mantida por 2 min, novamente aumentada para 310°C, em uma taxa de 3°C·min⁻¹, e mantida por 5 min (SASSAKI *et al.*, 2008).

Os cromatogramas obtidos foram analisados no software Saturn (2000R – Varian) e os picos identificados através de seus respectivos tempos de retenção relativo (*t_R*) comparados com padrões conhecidos (SASSAKI *et al.*, 2008) e confirmados pelo perfil de fragmentação resultante da ionização eletrônica com energia de 70 eV. A janela de massa utilizada foi de *m/z* 40-230.

4.6.3.2. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

Os extratos brutos (1 mg·mL⁻¹) obtidos das melhores condições de fermentação, tanto submersa (item 4.5.2) quanto sólida (item 4.5.3), e o padrão de surfactina (produzida por *B. subtilis* - 1 mg·mL⁻¹) da Sigma-Aldrich, foram solubilizados em CH₃OH:H₂O (7:3, v/v) e submetidos à investigação por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) no modo negativo, usando triplo quadrupolo do equipamento Quattro LC (Waters) com nitrogênio como gás de nebulização e dessolvatação. As análises foram feitas por injeção das soluções etanólicas das amostras com uma seringa diretamente na

fonte do ESI-MS em uma taxa de fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, com variação entre capilar de 2,5 kV e cone de 100 V. A abundância relativa de cada homólogo foi calculada pela intensidade do pico do homólogo dividida pela soma das intensidades dos picos de todos os homólogos (LI *et al.*, 2008).

A fragmentação dos homólogos foi feita nas seguintes condições: fragmentação no modo positivo, variação entre capilar de 3,53 kV, cone de 120 V e energia de colisão (CID) de 40 V. Para aquisição dos espectros, utilizou-se uma faixa de massa de m/z 40 a 1200.

4.6.3.3. Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE)

O biossurfactante presente nos extratos brutos das melhores condições de fermentação, tanto submersa (item 4.5.2) quanto sólida (item 4.5.3), foi quantificado por CLAE utilizando como padrão a surfactina comercial produzida pela Sigma-Aldrich. As análises de CLAE foram realizadas em um equipamento Shimadzu acoplado com detectores SPA-10 UV/Vis a 210 nm e ESI-MS. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C e a separação foi feita isocraticamente em uma coluna Phenomenex Synergi Fusion de fase reversa C_{18} (150 \times 4,6, 80A), usando uma mistura de acetonitrila:ácido trifluoroacético (3,8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) (80:20, v/v) como fase móvel a um fluxo de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As amostras foram dissolvidas em acetonitrila:metanol (1:1, v/v) (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 20 μL foram usados para a injeção (YEH *et al.*, 2005).

4.7. OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1. Teste do Espalhamento da Gota

O teste qualitativo do espalhamento da gota, para detecção inicial da produção de biossurfactantes pelas diferentes cepas, foi realizado em tampas de microplacas de 96 poços rasos. Estes foram untados com 2 μL de óleo de motor 10 W-40 e deixados em repouso por 24 h. Cinco μL dos sobrenadantes dos cultivos foram então colocados em cada um dos poços e o espalhamento das

gotas do óleo foi avaliado após 2 min. O resultado foi considerado positivo quando se percebeu visualmente o espalhamento da gota (YOUSSEF *et al.*, 2004).

4.7.2. Determinação da Tensão Superficial (TS)

A medida da tensão superficial (TS) foi feita nos sobrenadantes de cultivo pelo método do anel de Du Nouy, utilizando-se o tensiômetro Krüss disponível no Departamento de Física da UFPR. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel de platina inicialmente submerso. Uma força adicional é exercida sobre o anel e, no momento em que a lâmina do líquido vai se romper, a TS é determinada (KRÜSS, 1994).

As condições de análise foram padronizadas para todos os ensaios como volume médio da amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado no início das análises, medindo-se a TS da água destilada cujo valor situa-se em torno de 72 mN/m.

Os cálculos para o abaixamento da TS foram feitos considerando a TS inicial do meio de cultivo (sem inóculo).

4.7.3. Determinação da Diluição Micelar Crítica (DMC)

A diluição micelar crítica (DMC) foi utilizada para quantificação indireta da concentração de biossurfactante produzido pelas cepas estudadas. Para aumentar a precisão dos resultados, os experimentos foram realizados em triplicata. O método baseia-se em diluições seriadas das amostras até atingir-se o valor da CMC. Como tal, a diluição em que a TS começou a aumentar abruptamente, entre 30 e 35 mN/m, foi indicada como a DMC e considerada proporcional à quantidade de biossurfactante presente na amostra original (JOSHI *et al.*, 2008; RAZA *et al.*, 2007). As amostras utilizadas foram os sobrenadantes de cultura livre de células para a FS e o extrato aquoso livre de células para FES.

4.7.4. Medida do Índice de Emulsificação (*E*)

O índice de emulsificação (*E*) foi determinado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio, foram distribuídos 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, tolueno e gasolina) e em seguida

foram adicionados 4 mL dos sobrenadantes de cultura. Cada tubo foi agitado em Vórtex por 2 min e deixado em repouso por até 2 dias. A percentagem de emulsificação foi determinada a partir da Equação 1. As medidas foram realizadas após 5 min, 5 h, 24 h e 48 h de repouso.

$$E = \frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

4.7.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As diversas análises em CCD analítica foram realizadas em placas de sílica gel 60 com fluoresceína (Merck) e as análises em CCD preparativa foram realizadas em placas de vidro (20 cm x 20 cm) cobertas com sílica gel 60 com fluoresceína (Merck), utilizando a mistura $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (9:1) como eluente. A revelação das bandas foi feita com H_2SO_4 a 100°C por 5 min e com luz UV com comprimento de onda de 254 nm.

4.7.6. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) do Biossurfactante

Depois de conhecida a porcentagem de biossurfactante presente no extrato bruto, o valor da CMC foi convertido para biossurfactante ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), conforme a Equação 2.

$$\text{CMC} = \text{EB (mg}\cdot\text{L}^{-1}) \times \% \text{ BS no EB} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: EB = extrato bruto;

BS = biossurfactante.

4.7.7. Rendimento da Produção de Biossurfactante

Depois de determinada a CMC do biossurfactante produzido pelo *B. pumilus* e sendo o número de diluições proporcional à quantidade de biossurfactante presente no meio, tornou-se possível o cálculo da produção (Equação 3). É importante destacar que, para o cálculo do rendimento da FES por volume de solução umedecedora, a diluição da extração do biossurfactante do

sólido fermentado (100 mL de água destililada, item 4.4.3) foi levada em consideração (Equação 4).

$$\text{Produção por Volume de Meio} = \text{DMC} \times \text{CMC} \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{Produção por Volume de SU} = (\text{DMC} + \text{DE}) \times \text{CMC} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: DMC = diluição micelar crítica;

CMC = concentração micelar crítica ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

SU = solução umedecedora;

DE = diluição extração na FES.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

Primeiramente, foram realizados testes para avaliar se as cepas de *Bacillus* eram produtoras de biossurfactante através do teste do espalhamento da gota e do abaixamento da TS. As cepas que apresentaram resultado positivo foram cultivadas por FS utilizando glicerol e glucose como fonte de carbono, no intuito de escolher a condição que proporcionava maior produção de tensoativo. Uma vez selecionadas a cepa e a fonte de carbono, partiu-se para o estudo da produção de biossurfactante por FES.

5.1.1. Ensaios Preliminares de Produção de Biossurfactante por *Bacillus* sp

Ensaios preliminares de produção de biossurfactante revelaram que as cepas de *B. pumilus* e *B. subtilis* são produtoras de agente tensoativo, como pode ser visto na Tabela 4, onde estão os resultados para o teste do espalhamento da gota e o abaixamento da TS do sobrenadante de cultivo da FS e do extrato aquoso da FES.

Tabela 4. Seleção de cepas de *Bacillus* produtoras de biossurfactante.

Cepas de <i>Bacillus</i>	Processo fermentativo	Espalhamento da gota	Tensão superficial (mN/m)	Abaixamento da TS ³ (%)
<i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 447	FS ¹ FES ²	Não espalhou Não espalhou	54,2 ± 0,1 49,6 ± 0,9	6,6 ± 0,2 4,6 ± 1,7
<i>B. pumilus</i> UFPEDA 448	FS FES	Espalhou Espalhou	28,2 ± 0,4 33,8 ± 1,1	51,4 ± 0,7 35,0 ± 2,1
<i>B. subtilis</i> UFPEDA 456	FS FES	Espalhou Espalhou	29,2 ± 0,2 36,5 ± 1,5	49,7 ± 0,3 29,8 ± 2,9

¹FS: fermentação submersa; ²FES: fermentação no estado sólido; ³Tensão superficial do meio, antes do início do cultivo, 58 mN/m para FS e 52 mN/m para FES. Método do espalhamento da gota e determinação das tensões superficiais dos sobrenadantes de cultivo para fermentação submersa e dos extratos aquosos para fermentação no estado sólido.

O maior abaixamento de TS ocorreu para as cepas de *B. pumilus* e *B.*

subtilis cultivadas em FS (51,4 e 49,7%, respectivamente). Embora a FES tenha apresentado menores taxas de abaixamentos de TS (35 e 29,8%), estes resultados foram satisfatórios, uma vez que os extratos aquosos da FES estavam diluídos, pois, além da solução umedecedora (50 mL), mais 100 mL de água destilada foram utilizados para extração do biossurfactante dos sólidos fermentados.

Uma vez confirmado o potencial de produção de biossurfactante pelas cepas *B. pumilus* e *B. subtilis*, tanto por FS como por FES, novos ensaios foram feitos para selecionar o melhor microrganismo e a melhor fonte de carbono para produção de biossurfactante por FS.

5.1.2. Seleção do Microrganismo e da Fonte de Carbono para Produção de Biossurfactante por Fermentação Submersa

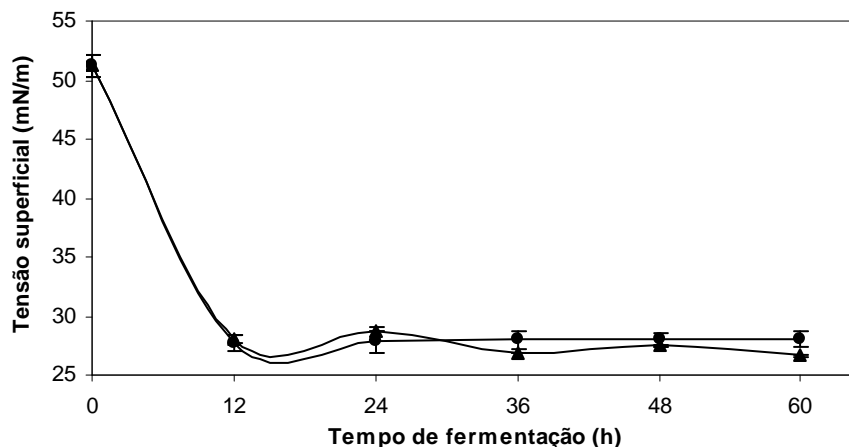
No experimento anterior, apenas a glucose foi usada como fonte de carbono em um tempo de cultivo fixo de 72 h. Nesta etapa do trabalho, duas fontes de carbono (glucose e glicerol) foram comparadas através das cinéticas de abaixamento da TS para *B. pumilus* e *B. subtilis* para seleção do melhor microrganismo e da melhor fonte de carbono. Por conveniência e facilidade do processo, os experimentos foram feitos por FS. A fermentação foi seguida por 60 h, com coleta de amostras a cada 12 h. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

Observou-se que *B. pumilus* promoveu o maior abaixamento da TS (28 mN/m) após 12 h para ambas as fontes de carbono, o glicerol e a glucose (Figura 8A). Os resultados obtidos para a cepa de *B. subtilis*, na Figura 8B, mostram que o abaixamento máximo da TS para aproximadamente 28 mN/m (ou o correspondente a 50% do valor inicial) ocorreu em 12 h e 24 h de cultivo, quando se utilizou glicerol e glucose como fonte de carbono, respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 8 não foram conclusivos em termos de quantificação do biossurfactante, pois apenas mostraram o máximo de abaixamento da TS para cada cepa. Adicionalmente, pode-se dizer que, quando o glicerol é utilizado como fonte de carbono para cepa de *B. subtilis*, a concentração micelar crítica (CMC) é atingida em um menor tempo de cultivo, cerca de 12 h antes, do que quando a glucose é utilizada, pois, a partir da CMC, mesmo que a

concentração do composto tensoativo aumente no meio, o valor de TS permanece constante (OBERBREMER *et al.*, 1990).

A)



B)

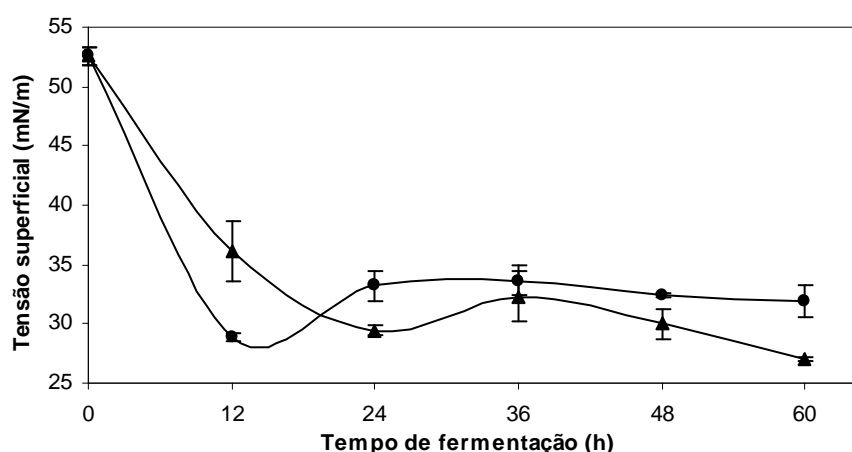


Figura 8. Variação da tensão superficial do sobrenadante dos cultivos. **A)** *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 e **B)** *Bacillus subtilis* UFPEDA 456, utilizando —●— glicerol e —▲— glucose como fonte de carbono. As amostras foram coletadas a cada 12 h dos cultivos seguidos até as 60 h.

Deste ponto em diante do trabalho, como não se conhecia a composição do biossurfactante, utilizou-se a diluição micelar crítica (DMC, item 4.7.3) para a sua quantificação indireta (JOSHI *et al.*, 2008, RAZA *et al.*, 2007). Note-se que a concentração do biossurfactante no meio é tanto maior quanto mais diluições forem necessárias para se atingir a CMC. Com este intuito, amostras coletadas nos diferentes tempos de cultivo foram sucessivamente diluídas e submetidas à determinação da TS.

Os resultados de DMC da cinética de produção de biossurfactante pelas cepas de *B. pumilus* e *B. subtilis*, utilizando glicerol ou glucose como fonte de carbono, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Determinação da diluição micelar crítica (DMC) dos sobrenadantes de cultura ao longo da cinética de produção de biossurfactantes por cepas de *Bacillus*

Tempo de Fermentação (h)	Número de diluições para atingir a CMC			
	<i>B. pumilus</i> UFPEDA 448		<i>B. subtilis</i> UFPEDA 456	
	Glicerol	Glucose	Glicerol	Glucose
12	16	4	2	1
24	16	4	1	4
36	16	16	1	4
48	16	8	1	16
60	16	8	1	8

Como pode ser observado na Tabela 5, os melhores resultados foram obtidos para a cepa de *B. pumilus* quando o glicerol foi utilizado como fonte de carbono, com a produção máxima do tensoativo (DMC = 16) com apenas 12 h, mantendo-se estável até 60 h de fermentação.

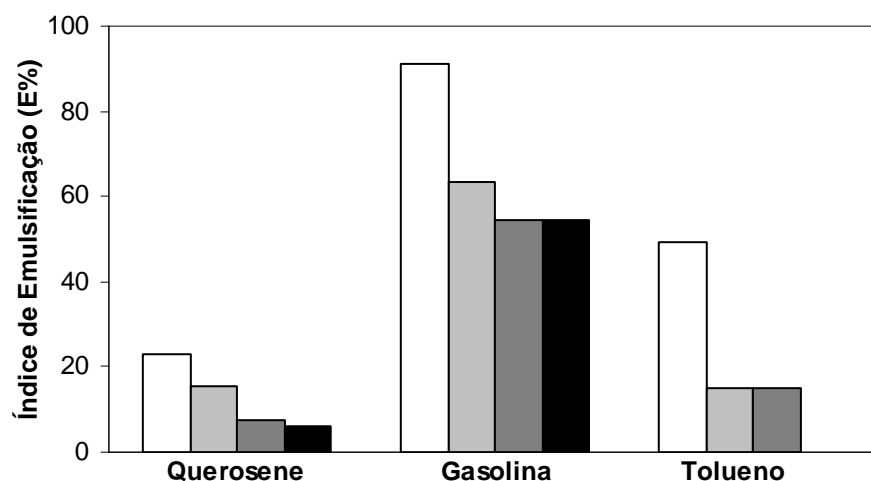
Por outro lado, quando se utiliza a glucose como fonte de carbono, a produção máxima (DMC = 16) ocorre com 36 h de fermentação e, nos tempos mais avançados de cultivo, ocorre uma diminuição na concentração de biossurfactante (DMC = 8). Este comportamento já havia sido relatado por Lin *et al.* (1993) para os lipopeptídeos produzidos por *B. licheniformis*, onde a glucose foi usada como fonte de carbono. Estes autores sugeriram que é pouco provável que este tensoativo seja usado como fonte de carbono ou energia pelas células e que ele é quimicamente estável no sobrenadante de cultura, mas que pode ser transportado para o interior das células na fase estacionária, possivelmente como parte de um mecanismo de absorção de DNA estranho.

Já para a cepa de *B. subtilis*, a produção máxima (DMC = 16) de biossurfactante foi obtida no meio com glucose somente depois de 48 h de fermentação. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Das e Mukherjee (2007) e Nitschke e Pastore (2006), que relataram que a produção máxima de biossurfactante para *B. subtilis* ocorre em 48 h.

Com o objetivo de selecionar o microrganismo e as melhores condições de produção para dar continuidade aos experimentos, realizaram-se ainda testes de

emulsificação de diferentes compostos hidrofóbicos com os sobrenadantes produzidos por ambas as cepas, nas melhores condições descritas na Tabela 5 (*B. pumilus*, glicerol, 12 h de cultivo; *B. subtilis*, glucose e 48 h de cultivo).

A)



B)

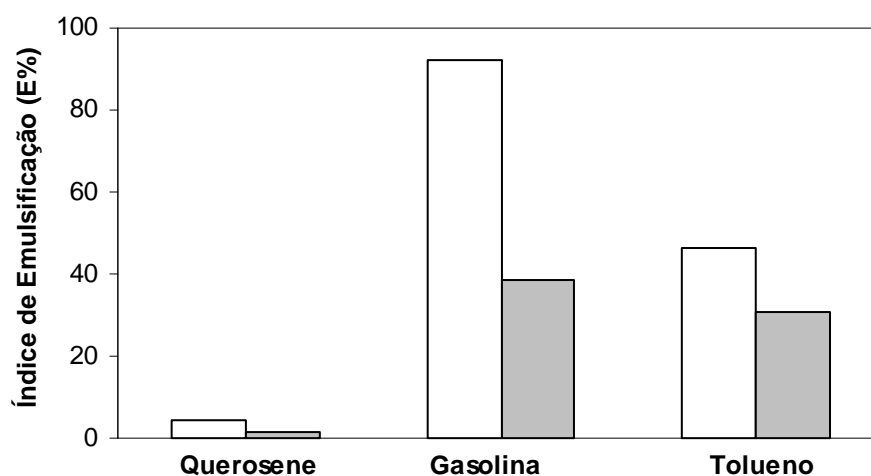


Figura 9. Índice de Emulsificação ($E\%$) do sobrenadante de cultura com vários hidrocarbonetos. Sobrenadante produzido por: **(A)** *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 (12 h de fermentação e glicerol como fonte de carbono) e **(B)** *Bacillus subtilis* UFPEDA 456 (48 h de fermentação e glucose como fonte de carbono). Índice de Emulsificação ($E\%$) realizado com vários hidrocarbonetos após 5 min (□) e 5 h (■), 24 h (■) e 48 h (■).

Os maiores índices de emulsificação foram obtidos para o sobrenadante de cultivo de *B. pumilus* com gasolina (Figura 9), cuja emulsão se manteve estável (54,5%) após 48 h de incubação. Para *B. subtilis*, as emulsões foram muito menos estáveis do que para *B. pumilus*, apresentando E menor que 40% para gasolina e tolueno e praticamente zero para o querosene após 5 h; após 24 h,

nenhuma emulsão permaneceu estável. Os resultados obtidos com *B. pumilus* contra a gasolina foram promissores, visto que Rahman *et al.* (2003), estudando duas cepas de *Bacillus* sp, obtiveram um índice de emulsificação de apenas 4 a 5% com gasolina após 24 h.

Calvo *et al.* (2004), quando utilizaram glucose como fonte de carbono para a cepa de *B. pumilus* 28-11, observaram que houve redução da TS de 53 para 27 mN/m durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo. Também perceberam que esta bactéria foi capaz de crescer e utilizar naftaleno como fonte de carbono e energia. Em outro estudo com *B. pumilus*, também houve o crescimento das oito cepas estudadas em naftateno, porém, apenas cinco cepas cresceram em pireno (TOLEDO *et al.*, 2006). Bento *et al.* (2005) utilizaram óleo diesel como fonte de carbono e observaram que houve a redução da TS para 49 mN/m e aumento da emulsificação para 59%.

Considerando os resultados de tempo para a máxima produção de biossurfactante (12 h) e os melhores índices de emulsificação encontrados para a cepa de *B. pumilus*, utilizando glicerol como fonte de carbono, esta foi selecionada para dar continuidade aos experimentos. A seção seguinte tratará do estudo da produção de biossurfactante por FES.

5.1.3. Seleção do Substrato Sólido para Produção de Biossurfactante por Fermentação no Estado Sólido

A Tabela 6 mostra as cinéticas de produção de biossurfactante por FES por *B. pumilus* para diferentes substratos sólidos. O melhor substrato sólido foi o Okara, que atingiu um valor de DMC = 32 após 36 h de cultivo. Adicionalmente, verificou-se que a utilização de substratos pobres em proteínas (bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de mandioca, farelo de milho, palha de arroz e espuma de poliuretano) (LIMA *et al.*, 2006), não apresentou bons resultados (DMC máxima de 2).

Makkar e Cameotra (2002) aumentaram em torno de 60% a produção de biossurfactante de *B. subtilis* MTCC2423 quando adicionaram aminoácidos (0,1 % de asparagina, aspartato, glutamato, lisina e valina) à fermentação. Estes aminoácidos foram usados diretamente como precursores para a síntese de biossurfactante, além de serem bons substratos (fonte de N) para a produção de

surfactina, resultando no aumento do rendimento do biossurfactante. O Okara apresenta cerca de 37% de proteína em sua composição (BOWLES e DEMIATE, 2006), podendo, portanto, atuar como precursor da síntese de lipopeptídeo para o *B. pumilus* e justificando, assim, seu alto rendimento para a produção de biossurfactante frente aos outros substratos sólidos.

Tabela 6. Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 por fermentação no estado sólido em diferentes substratos sólidos

Tempo de Fermentação	Número de diluições para atingir a CMC					
	Bagaço de cana-de-açúcar	Espuma de poliuretano	Okara	Palha de arroz	Bagaço de mandioca	Farelo de milho
12	2	*	1	1	2	2
24	2	*	2	2	2	2
36	2	*	32	*	2	2
48	*	*	32	*	2	2

*TS acima da CMC.

Neste ponto do trabalho, optou-se pela utilização de misturas de substratos sólidos que pudessem prover as condições necessárias para uma futura produção de biossurfactante em escala piloto, considerando que a utilização de Okara puro, por ter consistência pastosa, promove a compactação do meio, dificultado a aeração do sistema.

Como pode ser visto na Tabela 7, a mistura composta por Okara e espuma de poliuretano apresentou a mesma produção que o Okara puro, após 48 h de cultivo (DMC = 32). Em ambos os casos, a DMC foi superior à obtida nos cultivos de FS, quando um máximo de 16 foi obtido após 12 h de cultivo.

Tabela 7. Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 por fermentação no estado sólido, utilizando Okara e mistura de espuma de poliuretano com Okara

Tempo de Fermentação	Número de diluições para atingir a CMC	
	Okara ¹	Okara/Espuma de poliuretano
12	1	*
24	2	1
36	32	4
48	32	32
60	32	32

*TS acima da CMC; ¹Okara: resíduo da extração do leite de soja.

A grande vantagem da mistura de substratos está na melhora da aeração do sistema e no menor empacotamento do leito, o que proporciona a utilização de leitos mais profundos, tornando possível a realização de cultivos em escala piloto.

Os resultados aqui obtidos para a produção de biossurfactante por FES são importantes, pois, mesmo que o tempo de cultivo seja mais longo para a FES, as vantagens desta técnica, como a utilização de resíduos agroindustriais e a não formação de espuma durante o processo, devem ser consideradas.

A produção de lipopeptídeos por cepas de *Bacillus*, particularmente por *B. subtilis* e *B. licheniformis* por FES já vem sendo relatada na literatura (DAS e MUKHERJEE, 2007; VEENADING *et al.*, 2000; OHNO *et al.*, 1995), assim como a utilização do Okara como substrato sólido (OHNO *et al.*, 1995). Ohno *et al.* (1995) mostraram que, na produção de iturina e surfactina por *B. subtilis* RB14, a temperatura ótima de produção da iturina foi 25°C, enquanto que para a surfactina foi 37°C. Makkar e Cameotra (1997) utilizaram melaço como substrato para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* MTCC 2423 e *B. subtilis* MTCC 1427, obtendo uma produção máxima em 96 h e 72 h de fermentação, respectivamente. Das e Mukherjee (2007) compararam a eficiência de duas cepas de *B. subtilis*, DM-03 e DM-04, para a produção de biossurfactante em dois sistemas de fermentação, FS e FES, utilizando casca de batata como fonte de carbono. Ambas as cepas produziram quantidades apreciáveis de extrato bruto de lipopeptídeos: *B. subtilis* DM-03 produziu 80 g·kgSS⁻¹ em FS e 67 g·kgSS⁻¹ em FES, enquanto *B. subtilis* DM-04 produziu 23 g·kgSS⁻¹ em FS e 20 g·kgSS⁻¹ em FES.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus pumilus* UFPEDA 448

Depois de estudados os processos de produção de biossurfactante, tanto por FS quanto por FES, novos ensaios foram feitos para aperfeiçoar o processo de extração e de purificação deste biossurfactante, para, em seguida, realizar a sua caracterização físico-química, molecular e estrutural.

5.2.1. Processo de Extração do Biossurfactante

Os ensaios descritos abaixo foram feitos com o sobrenadante de cultivo de FS de *B. pumilus*, utilizando glicerol como fonte de carbono segundo as etapas descritas na Figura 7 (item 4.6.1).

O precipitado, obtido pela acidificação do sobrenadante de cultivo, foi solubilizado em água destilada e o pH da solução foi ajustado para 7,0 (GHOJAVAND *et al.*, 2008). Observou-se (Tabela 8) que o biossurfactante foi precipitado pela redução do pH, pois a TS do sobrenadante, resultante da precipitação ácida do meio de cultura, sofreu um abaixamento de apenas 15%, enquanto que o extrato bruto, resultante da extração orgânica do sobrenadante de cultura, apresentou uma redução de TS de 54%.

Tabela 8. Tensão superficial das amostras obtidas após a extração do biossurfactante do meio de cultura (fermentação submersa)

Frações da extração	Tensão Superficial (mN/m)	Abaixamento da TS ⁴ (%)
Sobrenadante ¹	49,4 ± 2,2	15 ± 3,8
Fase aquosa ²	47,9 ± 0,9	17 ± 1,5
Extrato bruto ³	31,2 ± 1,1	54 ± 1,9

¹Sobrenadante resultante da precipitação ácida do meio de cultura; ²Fase aquosa depois da extração clorofórmio:metanol; ³Extrato bruto: obtido após a extração com clorofórmio:metanol do precipitado do meio de cultura da FS, eliminação do solvente por evaporação e ressuspensão em água. ⁴Tensão superficial do meio, antes do início do cultivo, 58 mN/m.

5.2.2. Purificação do Biossurfactante

Após estudada a extração do biossurfactante, iniciaram-se experimentos no intuito de purificá-lo para posteriores análises moleculares, através de CG-EM. Para tanto, o extrato bruto, obtido da extração do sobrenadante de cultivo de *B. pumilus*, cultivado em FS utilizando glicerol como fonte de carbono, foi submetido à separação por CCD analítica. Houve separação de três bandas para a proporção de 9:1 da fase móvel CHCl₃:CH₃OH, onde uma banda foi visualizada na luz UV 254 nm (R_f = 4,8), e as outras duas com ácido sulfúrico (R_f = 3,2 e 8,5).

Em seguida, foram feitos ensaios com CDD preparativa, utilizando-se placas de vidro cobertas com sílica gel 60. O objetivo deste ensaio foi a obtenção de quantidades suficientes dos compostos de cada banda para a realização de

análises de abaixamento da TS e, assim, identificar em qual banda o biossurfactante estava presente.

Apenas a banda com Rf ao redor de 3,2 reduziu a TS da água de 72 mN/m para 26,3 mN/m. As outras duas bandas, com Rf em torno de 4,8 e 8,5, apresentaram um abaixamento TS para 46,7 e 44,5 mN/m, respectivamente.

Ensaio de extração e purificação do biossurfactante produzido por FES seguiram técnicas descritas no item 4.4.3, até a obtenção do extrato aquoso livre de células. A partir deste ponto, a metodologia foi a mesma descrita acima (item 4.2.1) para a FS.

5.2.3. Análise Molecular e Estrutural do Biossurfactante

5.2.3.1. Determinação dos aminoácidos do biossurfactante por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Os aminoácidos presentes na banda com Rf = 3,2, a única que reduziu consideravelmente a TS da água (63,5%), foram determinados por CG-EM na forma de ésteres metílicos de aminoácidos acetilados (SASSAKI *et al.*, 2008) (Figura 10). Segundo o tempo de retenção, foram encontrados resíduos dos aminoácidos leucina, valina, aspartato e glutamato. Esta composição de aminoácidos está de acordo com a estrutura relatada para a surfactina, que apresenta sete aminoácidos ligados em ciclo, quatro dos quais são a leucina e os outros três são valina, aspartato e glutamato (LU *et al.*, 2007). Ainda na Figura 10, existem picos consideráveis após o 14^o min de retenção, estes picos são referentes aos ácidos graxos do biossurfactante, mas não foram estudados de forma mais detalhada.

Para confirmação da presença destes aminoácidos, os espectros de massa de cada um deles (Figura 11) foram analisados e comparados com os padrões de fragmentação (SASSAKI *et al.*, 2008). Os resultados dessa análise podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Composição de aminoácidos presentes no biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 determinada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Aminoácido ¹	t _R (min)	Principais fragmentos de massa (m/z)
Valina	5,0	72, 114, 173
Leucina	6,3	43, 86, 127, 155, 187
Aspartato	7,9	43, 60, 102, 143, 204
Glutamato	10,5	84, 98, 116, 218

¹ Ésteres metílicos de aminoácidos acetilados analisados por CG-EM.

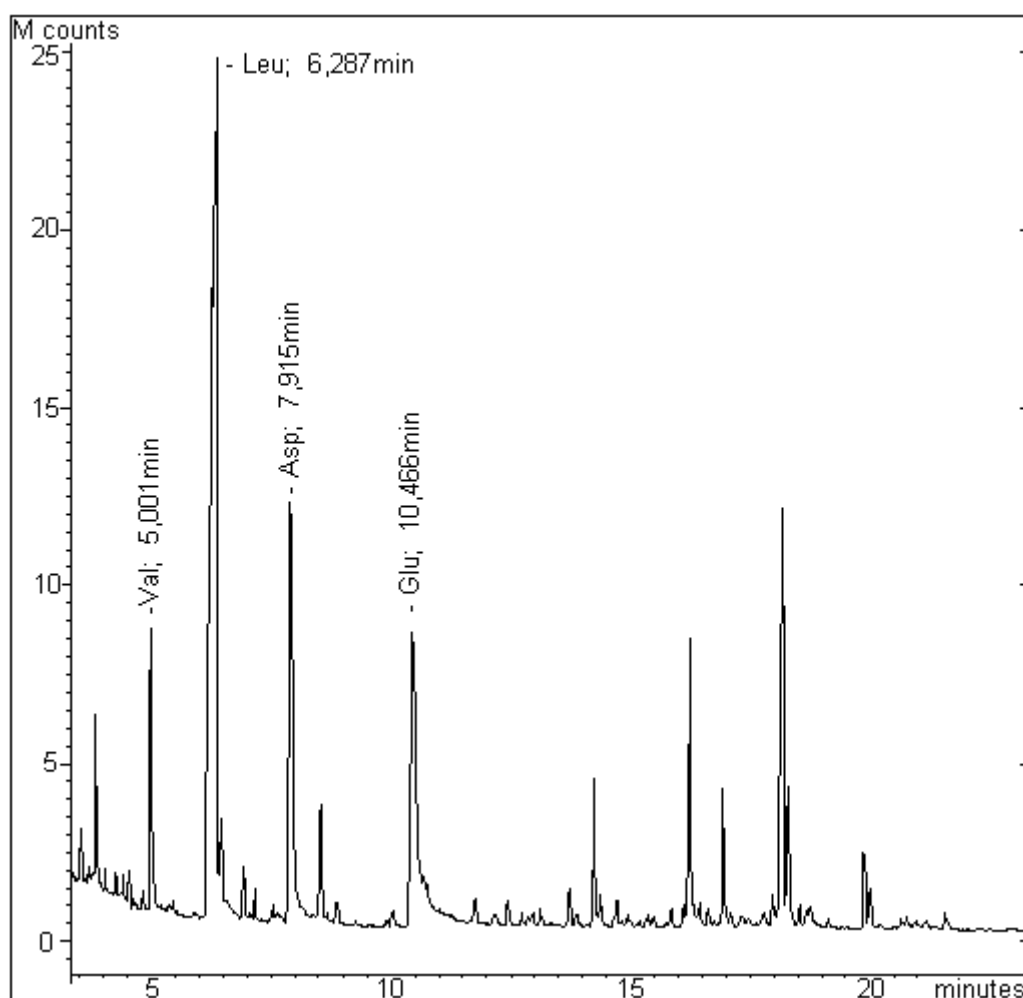


Figura 10. Composição de aminoácidos presentes no biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448. Cromatograma dos ésteres metílicos de aminoácidos acetilados.

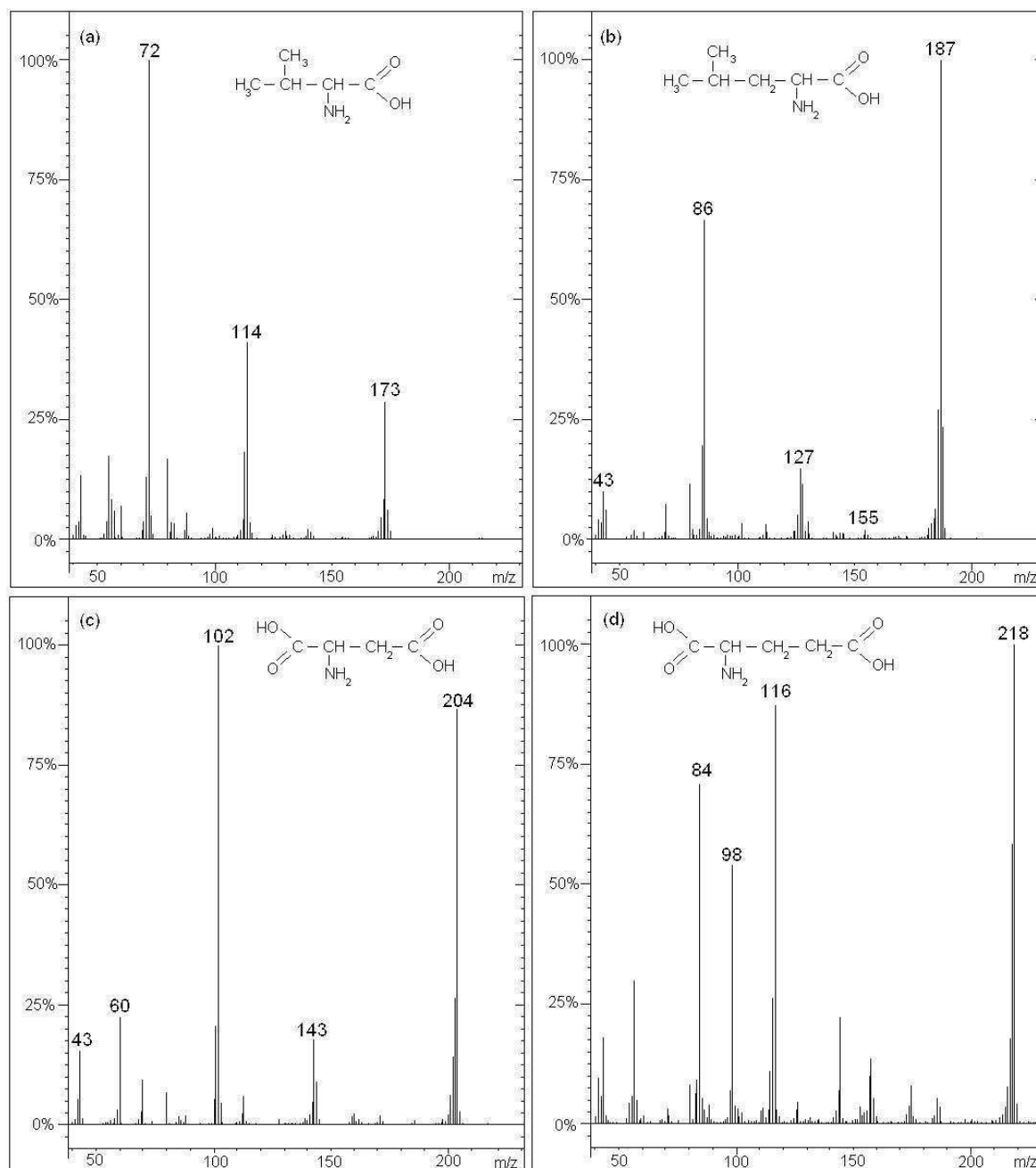


Figura 11. Composição de aminoácidos presentes no biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448. Espectros de massa da fragmentação dos ésteres metílicos de aminoácidos acetilados por ionização eletrônica. **(a)** Valina, t_R 5,0 min; **(b)** leucina, t_R 6,3 min; **(c)** aspartato, t_R 7,9 min e **(d)** glutamato, t_R 10,5 min.

Depois de conhecidos os diferentes aminoácidos que compunham as estruturas dos lipopeptídeos, necessitava-se saber a quantidade de cada um na estrutura, a sequência em que estão distribuídos e a mistura de homólogos e/ou isoformas que compõem o biossurfactante. Para tanto, foi utilizada a técnica de ESI-MS, descrita a seguir.

5.2.3.2. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

As análises por ESI-MS no modo negativo forneceram a composição dos homólogos do biossurfactante produzido por *B. pumilus*, quando cultivado por FS (12 h), FS com Okara (24 h), FES com Okara puro (36 h) e com uma mistura de Okara e espuma de poliuretano (48h), tendo o glicerol como fonte de carbono nas quatro condições. Inicialmente, foram comparados os espectros dos homólogos do padrão surfactina (Figura 12a) e da mistura de homólogos produzida nas quatro melhores condições de produção citadas acima. A Figura 12b mostra o espectro obtido para os homólogos produzidos por FS (12 h). Os espectros para as demais condições estão nos Apêndices.

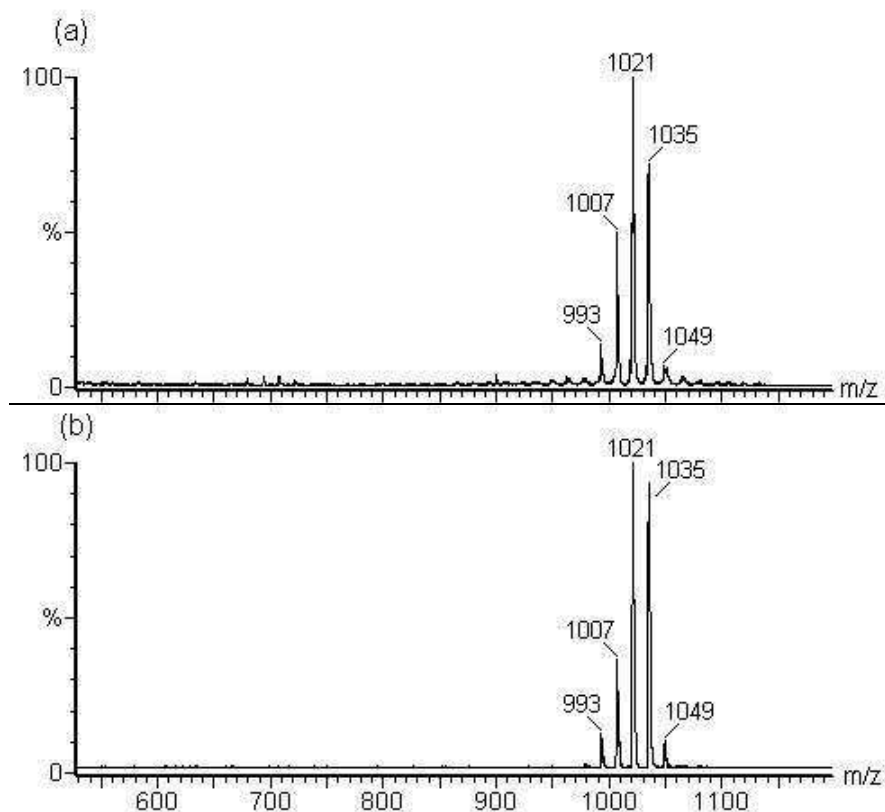


Figura 12. Homólogos presentes no biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448. Espectro de massa (ESI-MS), modo íon negativo, dos biossurfactantes: **(a)** Padrão surfactina (Sigma-Aldrich) produzida por *B. subtilis*; **(b)** Extrato bruto isolado do por *B. pumilus* UFPEDA 448, cultivado por 12 h em fermentação submersa tendo glicerol como fonte de carbono.

Na mistura de lipopeptídeos produzida por *B. pumilus* foram encontrados cinco diferentes compostos com mesmas massas molares para as quatro

condições de cultivo, cujos picos são semelhantes aos do padrão surfactina. Este resultado indica que os compostos produzidos possuem a mesma massa molar do padrão. Esses compostos são prováveis homólogos da surfactina, ou seja, todos apresentam os mesmos aminoácidos, mas o tamanho da cadeia do ácido graxo varia de 12 a 16 carbonos.

Outro resultado interessante obtido a partir dos espectros da ESI-MS refere-se à variação das proporções relativas dos cinco homólogos com a condição de cultivo utilizada (FS, FS com Okara, FES com Okara e FES com Okara e espuma de poliuretano). Estas proporções ou abundâncias relativas dos homólogos, calculadas de acordo com o descrito no item 4.6.3.2, estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Composição da mistura dos homólogos produzidos por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em diferentes condições de cultivo

Íons Moleculares ¹	Padrão de surfactina ² (%)	Processo Fermentativo e Substrato Sólido			
		FS ³ (%)	FS ³ – Okara (%)	FES ⁴ – Okara (%)	FES ⁴ - Okara e espuma (%)
		12 h	24 h	36 h	48 h
993	5,1	6,8	2,5	2,6	4,5
1007	14,6	22,1	18,1	14,2	12,7
1021	39,5	38,0	37,4	30,5	19,1
1035	36,8	29,7	42,0	52,7	63,7
1049	4,0	3,4	0	0	0

¹Homólogos analisados por ESI-MS, íon no modo negativo; ²Padrão de surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* (Sigma); ³FS: fermentação submersa; ⁴FES: fermentação no estado sólido.

Verificou-se na Tabela 10 que a abundância dos homólogos e sua composição variaram de acordo com a condição de cultivo estudada e com o tempo de fermentação. Para as condições em que foi utilizado o Okara como substrato sólido, não houve a produção do homólogo referente à massa 1049 e os percentuais do homólogo 1035 foram mais elevados que os do padrão e do produzido por FS. Os dois homólogos mais abundantes nas quatro condições foram os que possuem massa molar de 1021 e 1035, mas a proporção deles variou consideravelmente conforme a condição de cultivo. O homólogo com massa molar 1021 diminuiu 19% da FS para a FES utilizando Okara e espuma de poliuretano como substratos sólidos, enquanto o homólogo com massa molar 1035 aumentou 34%, nas mesmas condições citadas acima. Isto confirma que a composição do meio de cultura, bem como as condições de cultivo, podem

influenciar significativamente na produção dos homólogos do biossurfactante (FICKERS *et al.*, 2008; MULLIGAN e GIBBS, 1993).

A maioria dos trabalhos que fazem a comparação entre a variação estrutural de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus*, dependendo da condição de cultivo, utiliza a mudança de temperatura na produção destes biossurfactantes como parâmetro de variação. Ohno *et al.* (1995) mostraram a dependência da temperatura na produção da Iturina A e da surfactina por *B. subtilis* RB14 utilizando o processo de FES e Okara como substrato. Esse estudo revelou que a produção máxima da iturina acontece em 25°C e da surfactina em 37°. Ainda pode-se notar que as proporções dos homólogos da iturina variaram com a mudança de temperatura. Dos cinco homólogos produzidos, a proporção do homólogo *n*-C₁₄ diminuiu (aproximadamente 15%) com o aumento da temperatura (23°C para 37°C) e uma tendência completamente oposta foi notada para o homólogo *n*-C₁₆, que aumentou (de 5 para 25%) com o aumento da temperatura.

Fickers *et al.* (2008) também estudaram a influência da temperatura na produção de lipopeptídeos para duas cepas de *B. subtilis* (ATCC6633 e BBG100). O resultado obtido para ambas as cepas foi o mesmo: com o aumento da temperatura, houve o aumento do homólogo C₁₆ da micosubtilina (isoforma da família da iturina) e decréscimo do homólogo C₁₇.

Os resultados da ESI-MS apresentados acima não elucidam detalhes estruturais, especificamente, se a distribuição dos aminoácidos nos homólogos é também a mesma da surfactina. Para tanto, foi feita a fragmentação dos picos dos homólogos obtidos por ESI-MS, descrita a seguir.

5.2.3.3. Elucidação estrutural do biossurfactante por fragmentação dos picos dos homólogos obtidos por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS)

Para a elucidação estrutural, foram realizadas análises nos extratos brutos das melhores condições de produção obtidas, as mesmas citadas no item anterior (5.2.3.2). Cada homólogo obtido foi fragmentado, porém, somente será apresentado o espectro obtido para o homólogo com massa 1021 da FS (12 h), composto mais abundante para esta condição. Os espectros dos demais homólogos da FS encontram-se nos Apêndices.

Os resultados da fragmentação (Tabela 11) referentes aos homólogos de mesma massa, obtidos nas quatro condições distintas de produção [FS (12 h), FS com Okara (24 h), FES com Okara (36 h) e FES com Okara e espuma de poliuretano (48 h)], revelaram que as estruturas obtidas pelas diferentes formas de cultivo foram as mesmas, mudando apenas as abundâncias relativas de cada homólogo (vide item 5.2.3.2). Isto também foi observado por Das e Mukherjee (2007), que estudaram a produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* por FS e FES e demonstraram que não houve diferença qualitativa na composição de biossurfactantes produzidos em ambos os sistemas.

As análises de fragmentação no modo positivo forneceram as estruturas dos homólogos (Tabela 11). A fragmentação dos lipopeptídeos por espectrometria de massas, para a posterior análise de sua seqüência de aminoácidos, foi realizada por meio do processo de dissociação induzida por colisão. Neste processo, os lipopeptídeos foram inicialmente introduzidos em uma região de vácuo do espectrômetro de massas por meio do processo de *electrospray*. Os lipopeptídeos ionizados foram acelerados para uma região do espectrômetro preenchida com um gás inerte (argônio) proporcionando, assim, a colisão entre os lipopeptídeos ionizados e as moléculas do gás inerte. Como resultado, a energia translacional transferida em cada colisão foi convertida em energia interna, culminando na desestabilização das ligações do esqueleto polipeptídico e, por conseqüência, induzindo a formação de dois íon-fragmentos, que são classificados como íons que retêm a carga residual no lado N-terminal (gerando fragmentos *-a*, *-b* e *-c*, dependendo da ligação que é fragmentada) e íons que retêm a carga residual na região C-terminal (gerando os fragmentos *-x*, *-y* e *-z*, dependendo da ligação que é fragmentada), segundo a nomenclatura proposta por Roepstorff–Fohlmann–Biemann. É importante enfatizar que os pares de íons *-a/-x*, *-b/-y* e *-c/-z* serão sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Considerando-se que as ligações peptídicas são aquelas de menor energia, espera-se que a formação do par de fragmentos *-b/-y* seja mais freqüente que os demais pares de fragmentos, facilitando muito a interpretação dos espectros (CANTÚ *et al.*, 2008).

Analisando a Figura 13 e os dados da Tabela 11, pode-se perceber que os fragmentos *-y* (796, 667, 554, 441, 342, 227 e 114) e *-b'* (130, 243, 356, 455, 570, 683 e 796) são os mesmos para os cinco homólogos, pois são referentes à

sequência peptídica. Com esse resultado, fica claro que a sequência peptídica é a mesma para todos os homólogos, ou seja, *B. pumilus* UFPEDA 448, mesmo em diferentes condições de cultivo, produz uma única isoforma com a mesma sequência peptídica e essa isoforma é a mesma da Surfactina A produzida por *B. subtilis* (VATER *et al.*, 2002).

Foram produzidos cinco homólogos no total e como a sequência peptídica é a mesma para todos os homólogos, a diferenciação só pode estar associada a variação do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo. Essa hipótese é comprovada pelos fragmentos $-y'$ e $-b$ (Figura 13 e Tabela 11), que são variáveis, pois possuem o ácido graxo junto ao fragmento. Cada um dos picos referentes aos fragmentos $-y'$ e $-b$ do homólogo 993, por exemplo, é maior que o pico correspondente do homólogo 1007 em 14 *u*. A diferença de massa molar é a mesma (14 *u*) entre os picos correspondentes do homólogo 1007 e 1021, entre o 1021 e o 1035 e entre o 1035 e o 1051. Com esses dados, pode-se concluir que a cadeia do ácido graxo varia de 12 a 16 átomos de carbono. Com essa análise, foi possível determinar o tamanho da cadeia carbônica, mas não há dados suficientes para determinar se ela é *n*, *iso* ou *anteiso*.

Quando a fragmentação ocorre simultaneamente nas posições amino e carboxi-terminal do mesmo resíduo de aminoácido, íons imônio são produzidos (CANTÚ *et al.*, 2008). O íon imônio referente à Leu possui massa de 86 e o pico referente a esse íon é visto em todos os espectros (Figura 13 e Apêndices).

A Figura 13 mostra os íons esperados da fragmentação do homólogo 1021 e seu espectro de massa, comparado com o espectro do padrão da Surfactina A de *B. subtilis* (Sigma), comprovando a estrutura da Surfactina A e homólogo C₁₄. Também é esperado o fragmento referente à Leu-Asp-Val com massa 328, que não é mostrado na Figura 13. Os fragmentos esperados que não apareceram no espectro de massa foram assinalados com asterisco.

Tabela 11. Fragmentação dos homólogos da Surfactina A produzida por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448

Fragmentações	Homólogos				
	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆
y_1	114	114	114	114	114
y_2	227	227	227	227	227
y_3	342	342	342	342	342
y_4	441	441	441	441	441
y_5	554	554	554	554	554
y_6	667	667	667	667	667
y_7	796	796	796	796	796
b_1	198	212	226	240	254
b_2	328	342	356	370	384
b_3	441	455	469	483	497
b_4	554	568	582	596	610
b_5	653	667	681	695	709
b_6	768	782	796	810	824
b_7	881	895	909	923	937
y_1'	198	212	226	240	254
y_2'	310	324	338	352	366
y_3'	423	437	451	465	479
y_4'	538	552	566	580	594
y_5'	637	651	665	679	693
y_6'	750	764	778	792	806
y_7'	863	877	891	905	919
b_1'	130	130	130	130	130
b_2'	243	243	243	243	243
b_3'	356	356	356	356	356
b_4'	455	455	455	455	455
b_5'	570	570	570	570	570
b_6'	683	683	683	683	683
b_7'	796	796	796	796	796

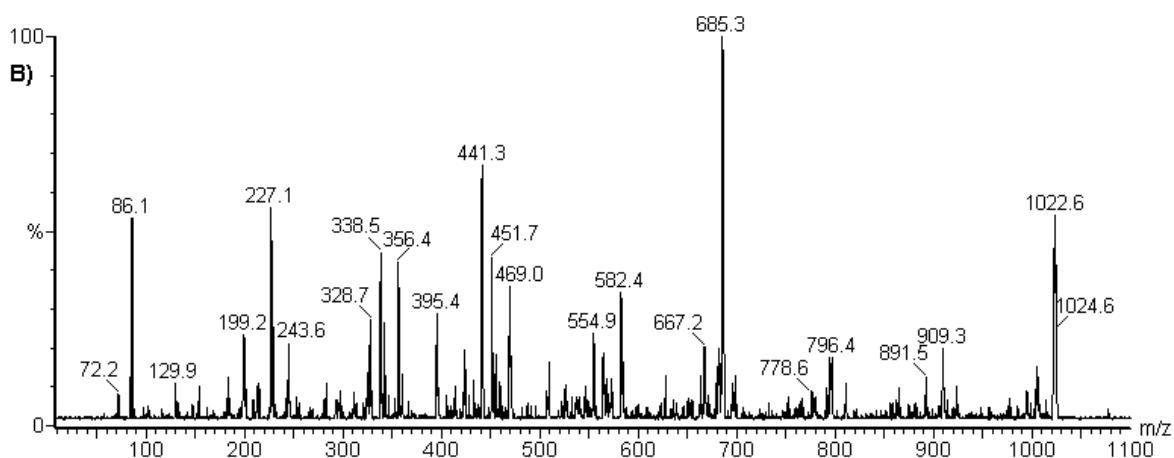
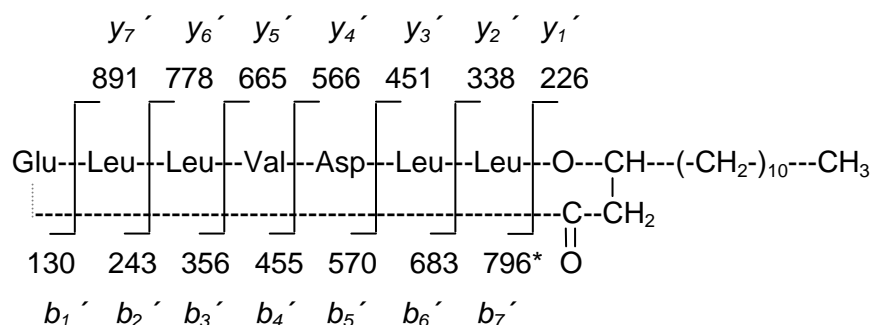


Figura 13. Íons esperados da fragmentação do homólogo C₁₄ da Surfactina A. **A)** Espectro de massa do padrão da surfactina produzido por *Bacillus subtilis*; **B)** Espectro de massa do homólogo C₁₄ produzido por *Bacillus pumilus*.

Morikawa *et al.* (1992) já haviam descrito que duas cepas de *B. pumilus* eram produtoras de surfactina, apresentando uma estrutura com massa molar de 1035 (Surfactina A, homólogo C₁₅), confirmando os resultados aqui obtidos. Por outro lado, Hsieh *et al.* (2004) afirmaram, segundo seus estudos, que *B. pumilus* ATCC 7061 não é produtor de surfactina, dados que, segundo os autores, foram confirmados por PCR e CLAE.

5.2.4. Quantificação do Biossurfactante por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

Depois de confirmadas as estruturas dos homólogos, necessitava-se ainda quantificar de forma mais precisa quanto de biossurfactante estava sendo produzido em cada uma das condições de cultivo estudadas, uma vez que anteriormente foi utilizado o parâmetro DMC para quantificar indiretamente a produção do biossurfactante, pois não se conhecia a sua composição química. Para isso, fez-se, primeiramente, uma análise por CLAE do padrão da surfactina produzido por *B. subtilis* (Figura 14A) e dos extratos brutos (frações residuais resultantes da extração com CHCl₃:CH₃OH) das condições otimizadas (Figura 14B). Observou-se que o perfil de eluição das amostras é o mesmo, confirmando os resultados da análise estrutural, ou seja, que o biossurfactante produzido é a Surfactina A. Em seguida, cada banda que apareceu no cromatograma da análise por CLAE foi identificada por ESI-MS (análise online). Na Figura 14B estão assinaladas as bandas com letras de *a-e*, e em seguida, na Figura 15, pode-se observar que as bandas *a*, *b*, *c*, *d* e *e*, são respectivamente os homólogos C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅ e C₁₆.

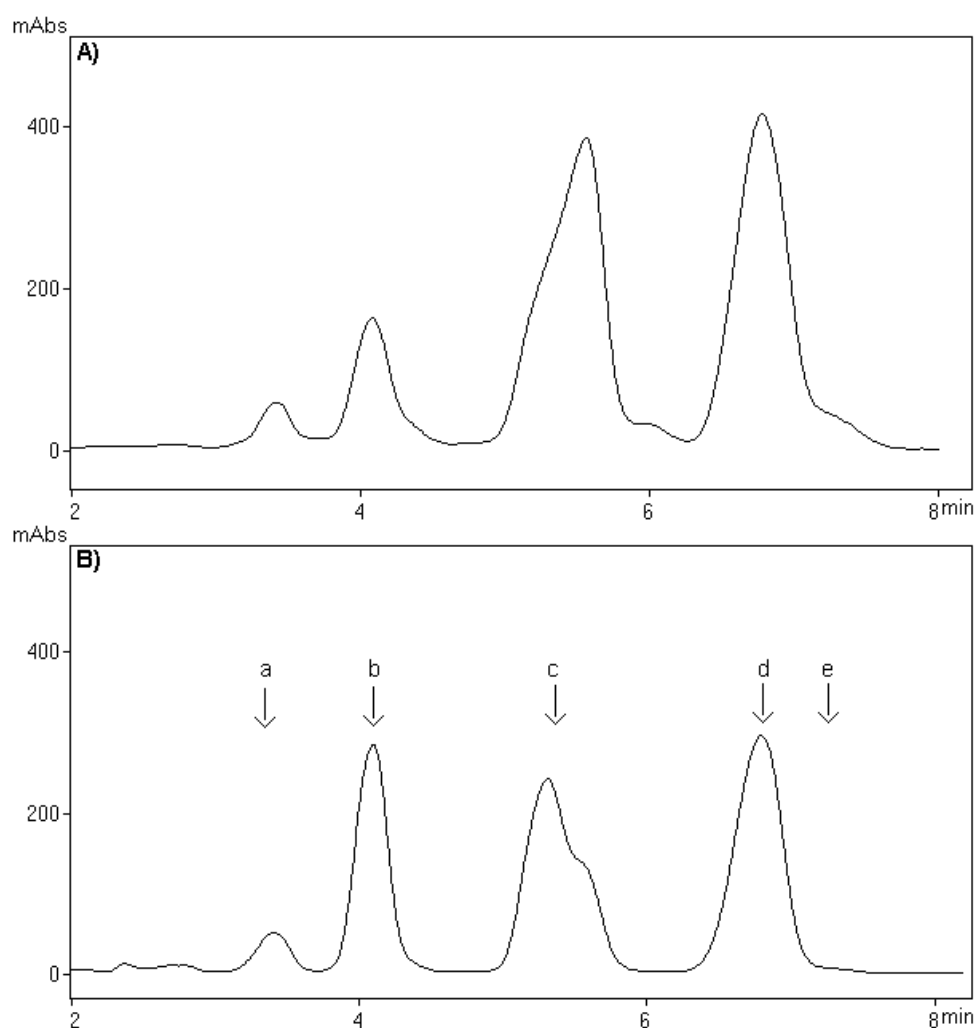


Figura 14. Cromatograma da análise por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) em luz UV 210 nm. **(A)** Padrão surfactina (Sigma-Aldrich) produzida por *B. subtilis*; **(B)** extrato bruto isolado do *B. pumilus* UFPEDA 448, cultivado por 12 h em fermentação submersa tendo glicerol como fonte de carbono. **(a)** Banda com tempo de retenção de 3,40 min; **(b)** banda com tempo de retenção de 4,06 min; **(c)** banda com tempo de retenção de 5,35 min; **(d)** banda com tempo de retenção de 6,78 min; **(e)** banda com tempo de retenção de 7,28 min.

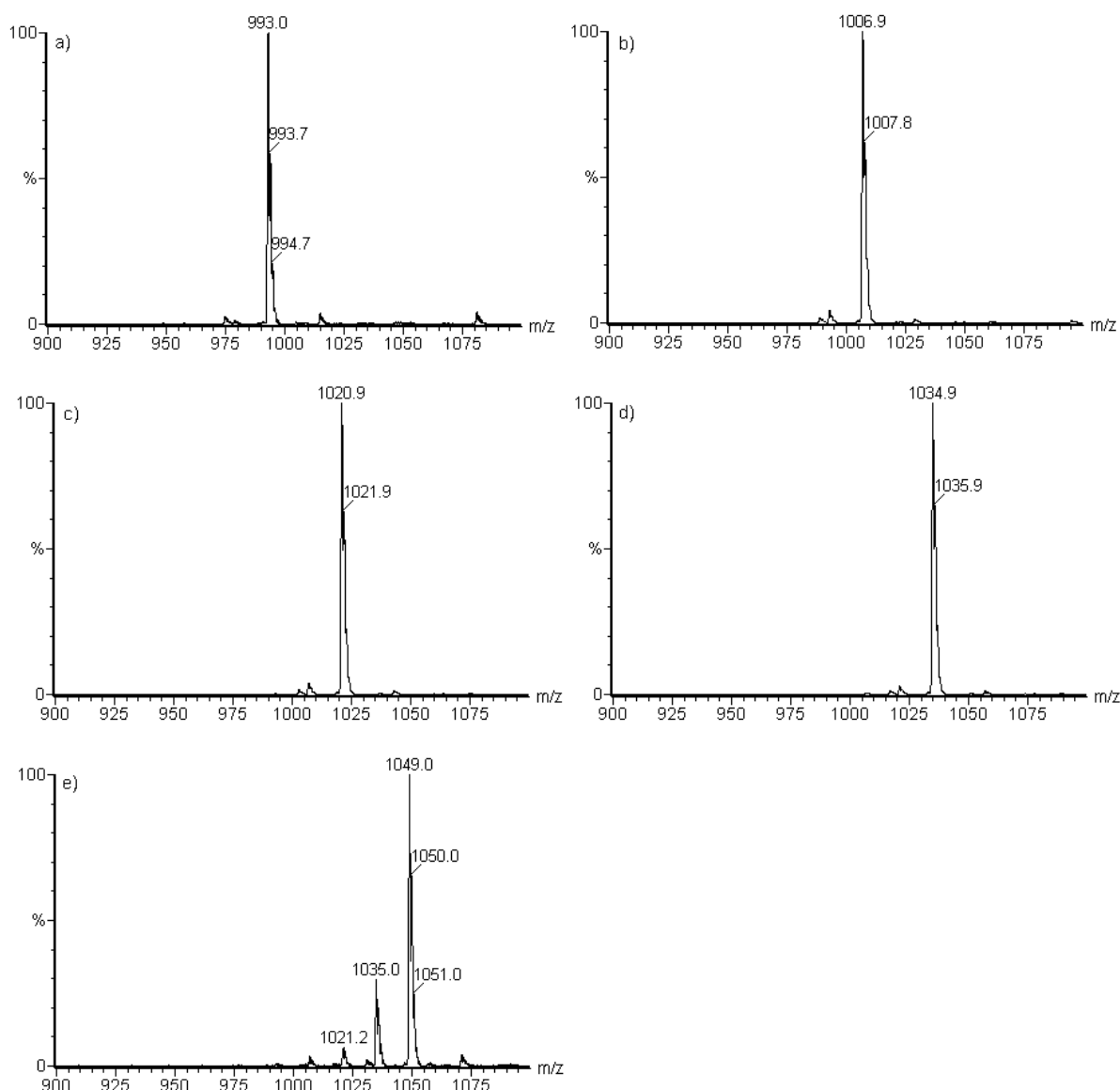


Figura 15. Determinação das bandas do cromatograma da análise por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (Figura 14B) do extrato bruto isolado de *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 (cultivado por 12 h em fermentação submersa tendo glicerol como fonte de carbono). **(a)** Banda com tempo de retenção de 3,40 min; **(b)** banda com tempo de retenção de 4,06 min; **(c)** banda com tempo de retenção de 5,35 min; **(d)** banda com tempo de retenção de 6,78 min; **(e)** banda com tempo de retenção de 7,28 min.

Em seguida, foi feita uma curva de calibração com o padrão de surfactina, sendo monitorada em luz UV 210 nm (Figura 16). Os extratos brutos (após extração com solventes orgânicos) das melhores condições de produção obtidas [FS (12 h), FS com Okara (24 h), FES com Okara (36 h) e FES com Okara e espuma de poliuretano (48 h)] foram analisados. Estes primeiros resultados de quantificação por CLAE mostram a quantidade de biosurfactante presente nos extratos brutos. Na Tabela 12 são mostrados os resultados para as diferentes condições de cultivo, onde se percebe que a pureza dos extratos brutos da FES é

baixa (3,3 e 3,5%). Na extração com solventes orgânicos, muitos subprodutos hidrofóbicos do Okara são provavelmente extraídos junto com o biossurfactante, comprometendo a pureza do extrato.

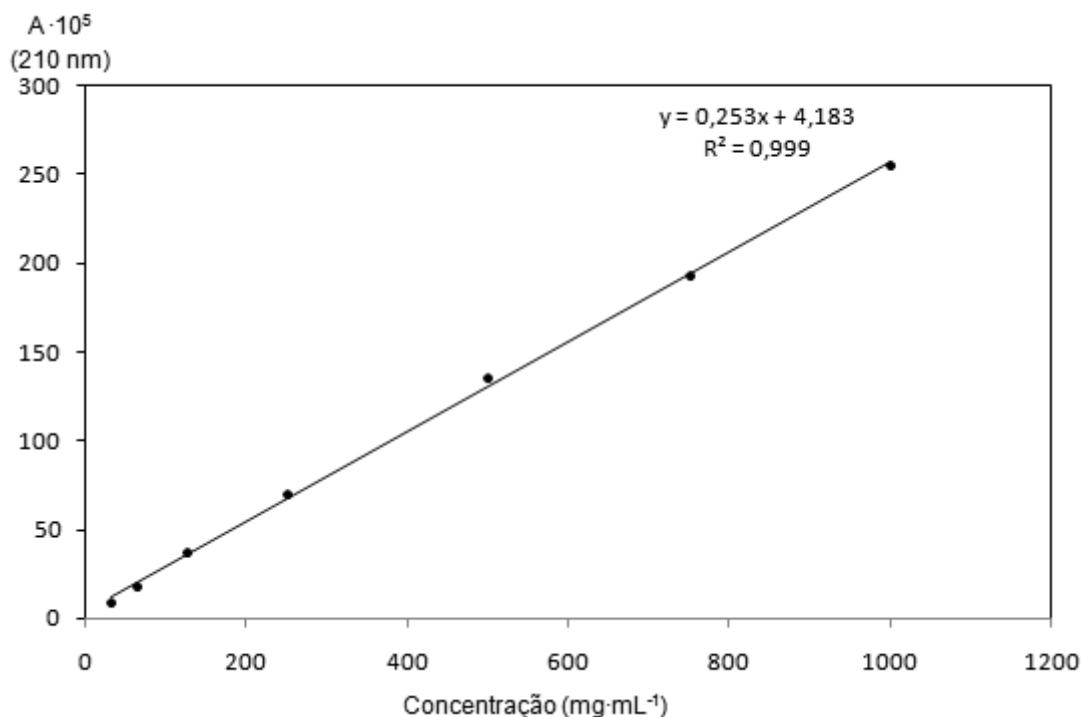


Figura 16. Curva de calibração da concentração do padrão de surfactina produzido por *Bacillus subtilis* versus a absorbância a 210 nm.

Tabela 12. Pureza do extrato bruto para as diferentes condições de cultivo

Processo Fermentativo e Substrato Sólido	Porcentagem de Biossurfactante no Extrato Bruto (%)
FS ¹ – 12 h	72,4
FS – Okara – 24 h	16,8
FES ² – Okara – 36 h	3,5
FES – Okara/Espuma – 48 h	3,3

¹FS: fermentação submersa; ²FES: fermentação no estado sólido.

5.2.5. Determinação da Concentração Micelar Crítica do Biossurfactante

Desenvolvido o método de quantificação do biossurfactante, as concentrações micelares críticas (CMC) foram determinadas para as quatro condições otimizadas de cultivo com seus extratos brutos. Os resultados foram obtidos para o extrato bruto (mg·L⁻¹), mas, como se conhecia a porcentagem de

biossurfactante presente nesse extrato, o valor da CMC foi convertido para biossurfactante ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para todas as condições, conforme a Equação 2 (item 4.7.6) .

A CMC foi similar para as quatro condições de cultivo citadas na Tabela 12, em torno de $5,4 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 17), sendo que a variação na composição dos homólogos, acarretada pelas diferentes condições, não ocasionou mudança na CMC. A baixa CMC encontrada mostra a eficiência deste biossurfactante e é menor que a relatada na literatura para a surfactina, que é aproximadamente $19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (BARROS *et al.*, 2007). Também é muito inferior que a CMC de outros biossurfactantes, como dos ramnolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentam uma CMC de $48,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (CAMILIOS NETO *et al.*, 2009). Quando a CMC do biossurfactante produzido por *B. pumilus* é comparada com a dos surfactantes químicos, fica clara a importância do aprimoramento da produção de biossurfactantes: o dodecil sulfato de sódio (SDS), surfactante químico comumente utilizado na indústria, apresenta uma CMC de $2333 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (TAVARES, 1997), ou seja, cerca de 430 vezes maior que a do biossurfactante produzido por *B. pumilus* UFPEDA 448 estudado neste trabalho.

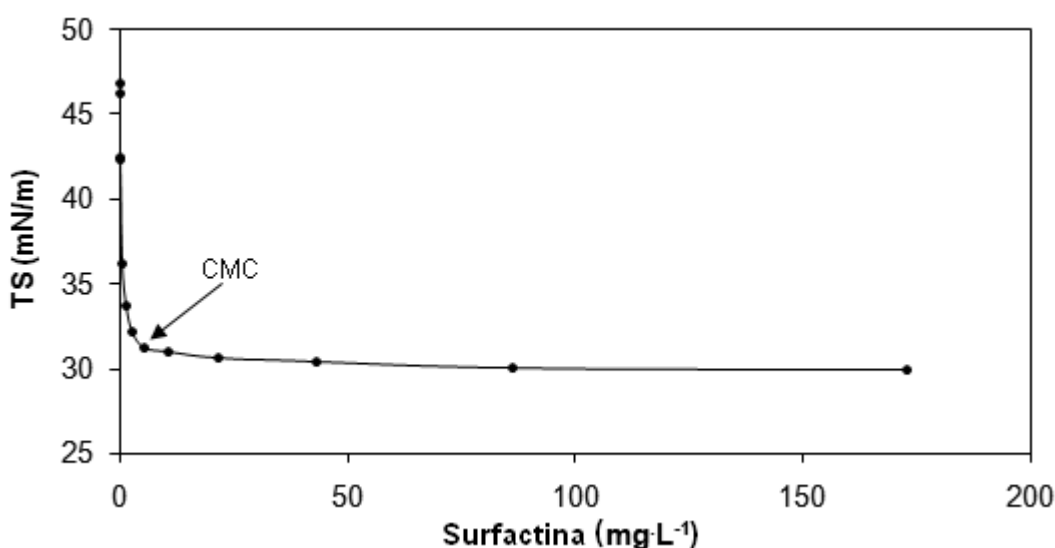


Figura 17. Determinação da concentração micelar crítica (CMC) em função da tensão superficial (mN/m), utilizando-se diferentes diluições do sobrenadante de cultura contendo o biossurfactante produzido por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448.

5.2.6. Comparação de Produção – Fermentação Submersa e Fermentação no Estado Sólido

Depois de determinada a CMC foi possível calcular o rendimento da produção de biossurfactante para as condições otimizadas de produção, visto que a quantificação havia sido feita de maneira indireta pela DMC na otimização da produção do biossurfactante (itens 5.1.2 e 5.1.3). Como o número de diluições é proporcional à quantidade de biossurfactante presente no meio, este cálculo tornou-se possível (Equação 3 e 4 , item 4.7.7).

Tabela 13. Produção de biossurfactante em diferentes condições de cultivo

Processo Fermentativo e Substrato Sólido	Produção por Volume de Meio ou Solução Umedecedora (mg·L ⁻¹)	Produção por Massa de Substrato Seco (mg·kg ⁻¹ SS)
FS ¹ – 12 h	86,4	nd
FS – Okara – 24 h	86,4	1728
FES ² – Okara – 36 h	205,2	410,4
FES – Okara/Espuma – 48 h	209,9	356,8

¹FS: fermentação submersa; ²FES: fermentação no estado sólido. Nd: não determinado.

A produção da FES por volume de solução umedecedora foi cerca de 2,4 vezes maior do que a obtida na FS (Tabela 13). Este resultado é interessante, visto que uma das justificativas da utilização da FES é a redução dos custos de produção de biossurfactante.

O melhor resultado para a produção por volume de solução umedecedora foi para a FES utilizando a mistura de substratos de Okara e espuma de poliuretano em 48 h de cultivo (210 mg·L⁻¹), que é muito menor do que a produção descrita para *B. subtilis* cultivado em fermentação submersa por Wei *et al.* (2007), 3,34 g·L⁻¹. Também no caso da comparação da produção por massa de substrato seco, o resultado obtido para a melhor condição, utilizando Okara como substrato (1,7 g·kg⁻¹SS), é menor do que o alcançado para *B. subtilis* por Ohno *et al.* (1995), 2,0 g·kg⁻¹SS, que também utilizou Okara como substrato para a FES. Estes resultados não são satisfatórios quando comparados com a literatura, mas são importantes porque justificam a continuidade dos estudos da otimização do processo de FES para produção de lipopeptídeos por *B. pumilus*.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram identificadas duas cepas de *Bacillus* produtoras de biossurfactantes, *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 e *Bacillus subtilis* UFPEDA 456, sendo que a melhor cepa, *B. pumilus*, foi objeto de aprofundamento dos estudos, que revelaram que:

- O biossurfactante produzido por *B. pumilus* em fermentação submersa, utilizando glicerol como fonte de carbono, apresentou as melhores taxas de produção, em um menor tempo de cultivo de 12 h. Apresentou, ainda, as melhores propriedades tensioativas, sendo capaz de produzir emulsões de gasolina com elevada estabilidade após 48 h ($E = 54\%$);
- Os substratos sólidos Okara e a mistura de Okara e espuma de poliuretano apresentaram um bom potencial de produção de biossurfactante para *B. pumilus*, sendo produzidos 410 e 357 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{SS}$, respectivamente;
- A maior produtividade por volume de solução umedecedora foi alcançada pela fermentação no estado sólido com Okara e espuma de poliuretano, sendo 2,4 vezes maior que a obtida por fermentação submersa;
- *B. pumilus* UFPEDA 448 produz somente uma isoforma, a Surfactina A, mesmo mudando as condições de cultivo, e cinco homólogos, com variação no comprimento da cadeia do ácido graxo, sendo eles: C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} e C_{16} , sendo C_{14} e C_{15} os mais abundantes;
- As mudanças das condições de cultivo alteram a composição e as proporções dos homólogos. O homólogo C_{16} desaparece quando o Okara é introduzido no meio de cultura; o homólogo C_{14} passa de uma proporção de 38% na FS para 19% na FES utilizando Okara e espuma de poliuretano como substratos sólidos, enquanto o homólogo C_{15} passa de uma proporção de 30% para 64%, nas mesmas condições citadas acima;
- A concentração micelar crítica para a mistura produzida em todas as condições estudadas foi de 5,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mostrando que a alteração nos homólogos não causa modificações nesta propriedade físico-química do biossurfactante.

7. PERSPECTIVAS

Este foi um trabalho pioneiro de exploração das possibilidades de produção de biossurfactantes por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448, com ênfase no processo de FES, que abre para continuação dos estudos, sugerindo-se, particularmente:

- Otimizar a produção de biossurfactante por FES, uma vez que os rendimentos ainda foram baixos se comparados com os descritos na literatura;
- Estudar a utilização de novos substratos que possibilitem o desenvolvimento do processo;
- Fazer o escalonamento do processo de produção por FES para escala piloto em Biorreator com capacidade de 200 kg de leite;
- Otimizar o processo de extração e de purificação do biossurfactante;
- Aprofundar a caracterização do biossurfactante, com respeito às suas propriedades físico-químicas (índice de emulsificação frente a diferentes compostos e tensão interfacial, por exemplo) e às suas propriedades antibióticas;
- Caracterizar os ácidos graxos;
- Desenvolver estudos de aplicação do biossurfactante.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWafa, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, ed. 3, p. 305-325, 2008.

AHIMOU, F.; JACQUESB, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, ed. 10, p. 749-754, 2000.

AL-AJLANI, M.M.; SHEIKH, M.A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 17, 2007.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, ed. 3, p. 488–494, 1968.

BANAT, I. M.; Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal state of the art. **Acta Biotechnologica**, v. 15, ed. 3, p. 251-267, 1995.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

BATRAKOV, S.G.; RODIONOVA, T.A.; ESIPOV, S.E.; POLYAKOV, N.B.; SHEICHENKO, V.I.; SHEKHOVTSOVA, N.V.; LUKIN, S.M.; PANIKOV, N.S.; NIKOLAEV, Y.A. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1634, ed. 3, p. 107-115, 2003.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, JR. W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160, p. 249-255, 2005.

BERNHEIMER, A. W.; AVIGAD, L.S. Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of General Microbiology**, v. 61, p. 361–369, 1970.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantification and screening of biosurfactant producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.

BOWLES, S.; DEMIATE, I.M. Caracterização físico-química de *okara* e aplicação em pães do tipo francês. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 652-659, 2006.

CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPES, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. **Journal of Biotechnology**, v. 109, ed. 3, p. 255-262, 2004.

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Otimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, ed. 3, p. 441-448, 2008.

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; TIBURTIUS, E.; ZAMORA, P.P.; BUGAY, C.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils. **Biotechnology Journal** - *submetido*.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CHRISTOVA, N.; TUVELA, B.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B. Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 59, ed. 3-4, p. 205-208, 2004.

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

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, ed. 8, p. 1191-1199, 2007.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, ed. 6, p. 1675-1684, 2008.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; JACQUES, P.; THONART, P.; PAQUOT, P. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, ed. 1-2, p. 3-10, 1999.

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.

DEXTER, A.F.; MIDDELBERG, A.P.J. Peptides as functional surfactants. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 6391-6398, 2008.

FICKERS, P.; LECLÈRE, V.; GUEZ, J.S.; BÉCHET, M.; COUCHENEY, F.; JORIS, B.; JACQUES, P. Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 449-457, 2008.

FOLMSBEE, M.; DUNCAN, K.; HAN, S.O.; NAGLE, D.; JENNINGS, E.; MCLNERNEY, M. Re-identification of the halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus licheniformis* strain JF-2 as *Bacillus mojavensis* strain JF-2, **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, ed. 8, p. 645-649, 2006.

FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, ed. 3, p. 235-240, 2000.

GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M.M. Surface-active compounds from microorganisms. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A.K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, ed. 1-2, p. 172-176, 2008.

HSIEH, F.C.; LI, M.C.; LIN, T.C.; KAO, S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, v. 49, p. 186-191, 2004.

HUSZCZA, E.; BURCZYK, B. Biosurfactant production by *Bacillus coagulans*. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, ed. 1, p. 61-64, 2003.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G.E.; MCINNERNEY, M.J.; KNAPP, R.M. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, ed. 3, p. 698-700, 1985.

JOSHI, S.; YADAV, S.; DESAI, A.J. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, ed. 2, p. 122-127, 2008.

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

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

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. Biosurfactants and biotechnology. **Surfactant Science Series**, v. 25, p. 247-331, 1987.

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Febs Letters**, v. 231, n. 1, ed. 1, p. 107-110, 1988.

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D.A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. In: SEN, R. (Org) **Biosurfactants**. Georgetown: Lands Bioscience, 2009.

KRÜSS. Processor Tensiometer K12. Hamburg, 1994. Manual

LEE, B.S.; KIM, E.K. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, ed. 6-7, p. 639-647, 2004.

LEE, S.C.; KIM, S.H.; PARK, I.H.; CHUNG, S.Y.; CHOI, Y.L. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. **Archives of Microbiology**, v. 188, ed. 4, p. 307-312, 2007.

LI, Y.M.; HADDAD, N.I.A.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 14, ed. 3, p. 229-235, 2008.

LIMA, D.M.; COLUGNATI, F.A.B.; PADOVANI, R.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SALAY, E.; GALEAZZI, M.A.M. **TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos)**, ed. 2, Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 113 p., 2006.

LIN, S.C.; LIN, K.G.; LO, C.C.; LIN, Y.M. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, ed. 4, p. 267-273, 1998.

LIN, S.C.; SHARMA, M.M.; GEORGOIU, G. Production and deactivation of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Progress**, v. 9, ed. 2, p. 138-145, 1993.

LIU, X.Y.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Isolation and characterization of a C-12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **Journal of Peptide Science**, v. 14, ed. 7, p. 864-875, 2008.

LU, J.R.; ZHAO, X.B.; YASSEN, M. Biomimetic amphiphiles: Biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, ed. 2, p. 60-67, 2007.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 5, ed.1, p. 11-17, 2002.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997.

MARAHIEL, M.A.; DANDERS, W.; KRAUSE, M.; KLEINKAUF, H. Biological role of gramicidin-S in spore functions. Studies on gramicidin-S negative mutants of *Bacillus brevis* 9999. **European Journal of Biochemistry**, v. 99, ed. 1, p. 49-52, 1979.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. v.1, ed. 1, Heidelberg: Springer, 450 p., 2006.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors **Process Biochemistry**, v. 35, ed. 10, p. 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K.; DURAND, A.; RENAUD, R.; ALMANZA, S.; MARATRAY, J.; DESGRANGES, C.; CROOKE, P.S.; HONG, K.; MALANEY, G.W.; TANNER, R.D. Reactor design. **Solid Substrate Cultivation**. Doelle, H.W.; Mitchell, D.A.; Rolz, C.E. (eds.) Elsevier Applied Science. London. p. 115-139. 1992.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, ed. 2-3, p. 137-147, 2003.

MOHAMMAD, J.; JENNEMAN, G.E.; MCINERNEY, M.J.; KNAPP, R.M. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 698-700, 1985.

MONTEIRO, S.A. Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. **Tese (Doutorado)**, 116 p., Curitiba, 2007.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENGERTDY, R.P. Principles of the solid substrate fermentation. **Filamentous Fungi**. Ed. 4, JE Smith, DR Berry and B Kristianse, E Arnold. (eds.), p. 117–144, 1983.

MORIKAWA, M.; ITO, M.; IMANAKA, T. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 74, n. 5, p. 255-261, 1992.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: KOSARIC, N (Ed.), **Biosurfactants, Productions, Properties, Applications**. New York: Marcel Dekker, p. 329-371, 1993

NEVES, L.C.M.; OLIVEIRA, K.S.; KOBAYASHI, M.J.; PENNA, T.C.V.; CONVERTI, A. Biosurfactant prodution by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined Glucose/casein-based media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 539-554, 2007.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇAVES, L.A.G.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

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.

OBERBREMER, A.; MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 485–489, 1990.

OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state. **Fermentation Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 517-519, 1995.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v. 9, ed. 4, p. 1084-1090, 2007.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. The potential of bacterial isolates for emulsification with a range of hydrocarbons. **Acta Biotechnology**, v. 23, ed. 4, p. 335-345, 2003.

RAZA, Z.A.; REHMAN, A.; KHAN, M.S.; KHALID, Z.M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, v. 18, ed. 1, p. 115-121, 2007.

ROMERO, D.; VICENTE, A.; OLMOS, J.L.; DÁVILA, J.C.; PÉREZ-GARCÍA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 969-976, 2007.

SAMSON, R.; CSEH, T.; HAWARI, J.; GREER, C.W.; ZALOUM, R. Biotechnologies appliquées à la restauration de sites contaminés avec d'application d'une technique physico chimique et biologique pour les sols contaminés par des BPC. **Science et Techniques de l'Eau**, v. 23, p. 15–18, 1990.

SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R.M. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4585-4588, 2000.

SANTOS, C.F.C. Produção, purificação e caracterização de biossurfactante produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis*. **Tese (Doutorado)**, 214 p., Campinas, 2001.

SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; SERRATO, R.V.; CIPRIANI, T.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Applications of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 215-222, 2008.

SCHALLER, K.D.; FOX, S.L.; BRUHN, D.F.; NOAH, K.S.; BALA, G.A. Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 827-836, 2004.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 714-724, 2008.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Applications aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, p. 142-146, 2004.

SHOJI, J.; KATO, T. Studies on antibiotics from Genus *Bacillus* 7 amino-acid sequence of cerexin-A. **Journal of Antibiotics**, v. 28, ed. 10, p. 764-769, 1975.

SUZUKI, T.; HAYASHI, K.; FUJIKAWA, K.; TSUKAMOTO, K. The chemical structure of polymyxin E. The identities of polymyxin E1 with colistin A and polymyxin E2 with colistin B. **Journal Biochemistry**, v. 57, p. 226-227, 1965.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I.M. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 24, ed. 7, p. 917-925, 2008.

TOLEDO, F.L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 244-252, 2006.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin – A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **Journal of Antibiotics**, v. 39, ed. 7, p. 888-901, 1986.

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.

VEENANADIG, N.K.; GOWTHAMAN, M.K.; KARANTH, N.G.K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000.

WANG, J.; XU, H.K.; GUO, S.H. Isolation and characteristics of a microbial consortium for effectively degrading phenanthrene. **Petroleum Science**, v. 4, ed. 3, p. 68-75, 2007.

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* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, ed. 1, p. 40-45, 2007.

WEI, Y.H.; WANG, L.F.; CHANG, J.S.; KUNG, S.S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 174-178, 2003.

YAKIMOV, M.M.; ABRAHAM, W.R.; MEYER, H.; GIULIANO, L.; GOLYSHIN, P.N. Structural characterization of lichenysin A components by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1438, ed. 2, p. 273-280, 1999.

YEH, M.S.; 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.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S.; Enhanced production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress Biochemistry**, v. 21, p. 1329–1334, 2005.

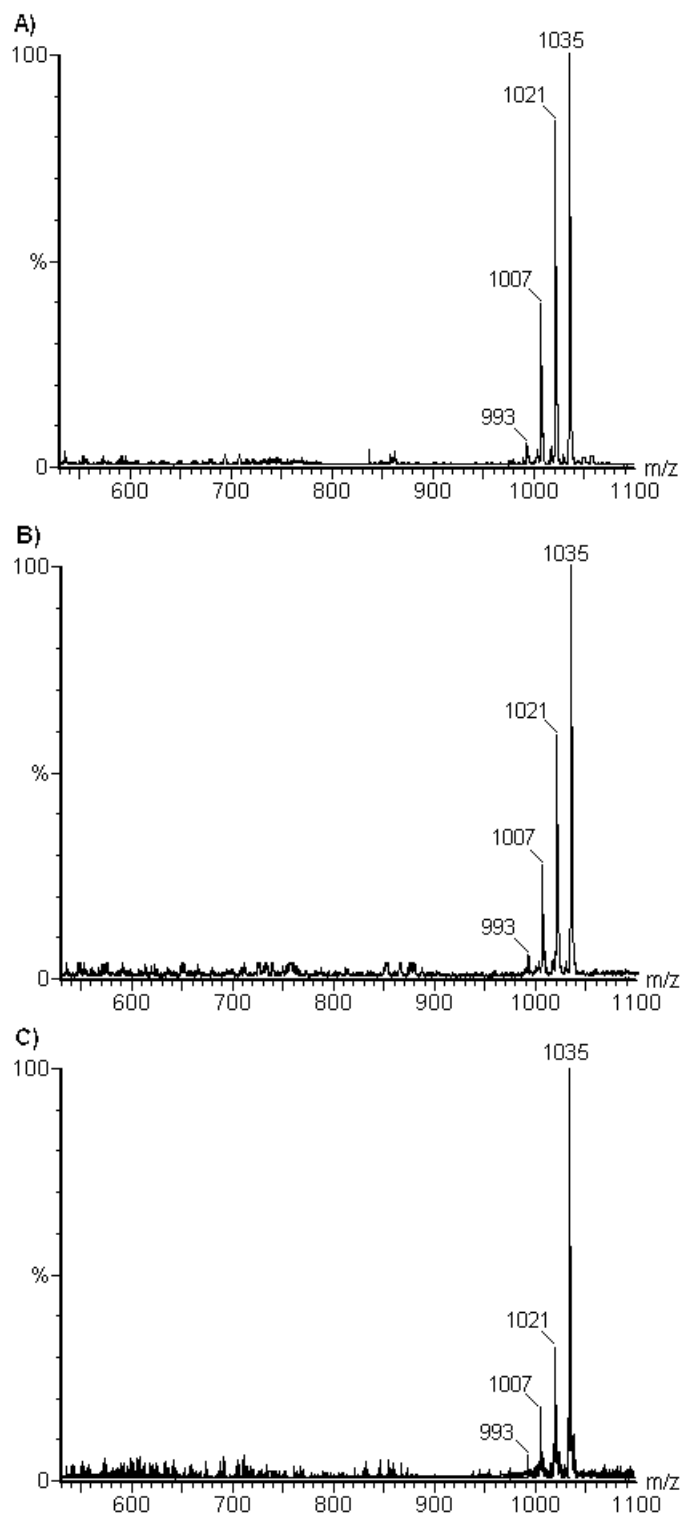
YONEDA, T. *et al.* (inventores). SHOWA DENKO K.K. (cessionário). Production process of surfactin. US Patent 2006: 7011969.

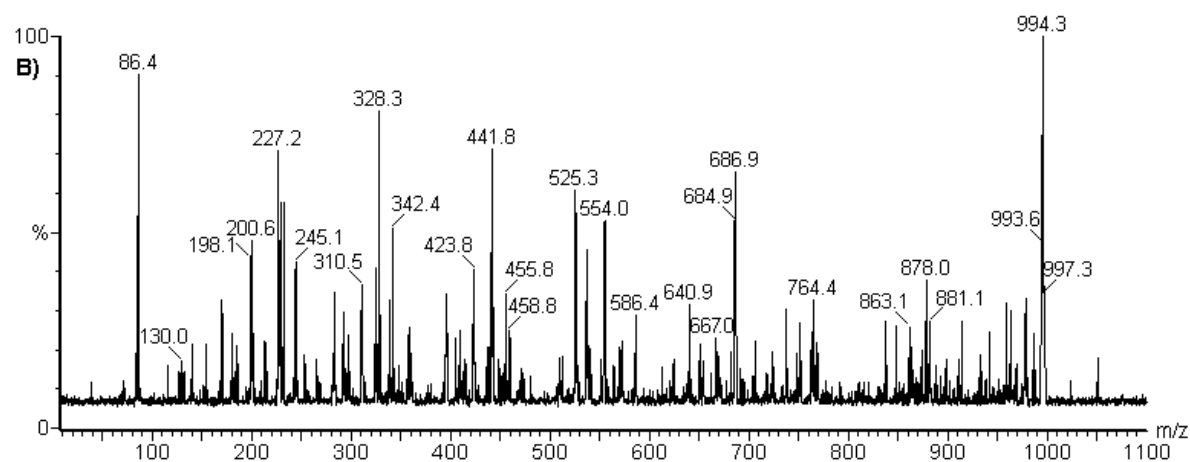
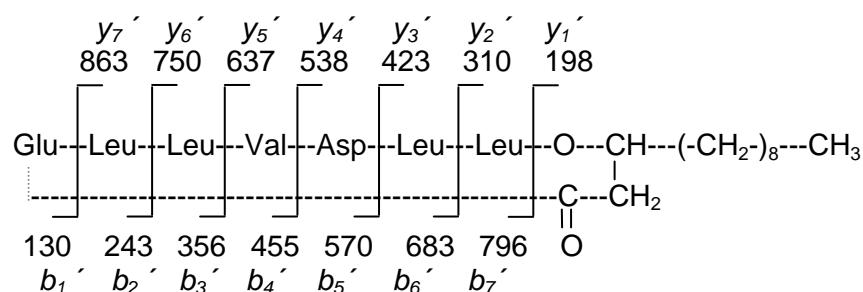
YOUSSEF, N.H.; DUCAN, K.E.; NAGLE, D. P., SARVAGE, K. N., KNAPP, R.M., MCIRNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal Microbiological Methods**, v.56, p. 339-347, 2004.

ZAJIC, J.E.; SEFFENS, W. Biosurfactants. **CRC Critical Reviews Biotechnology**, v. 1, ed. 2, p. 87-107, 1984.

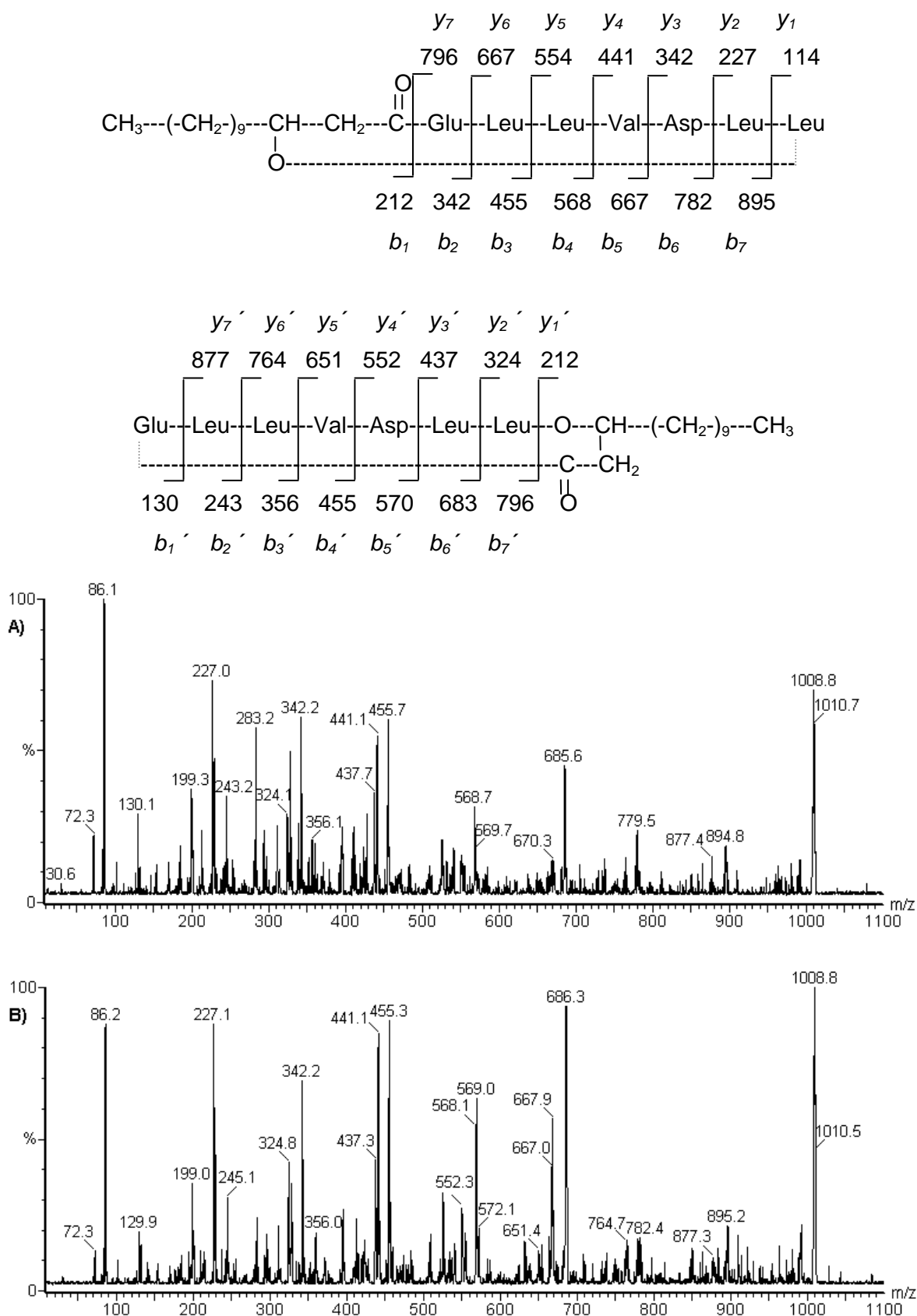
APÊNDICES

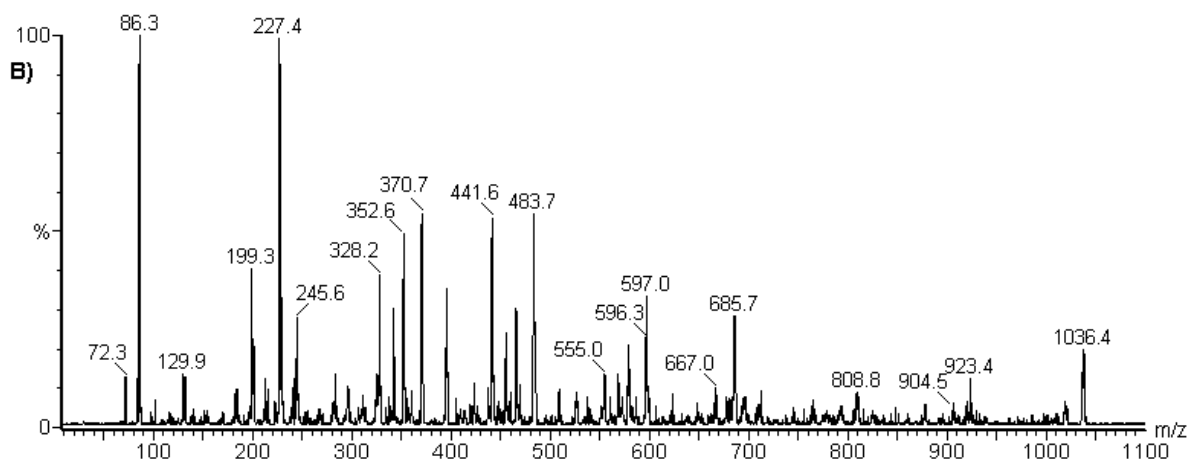
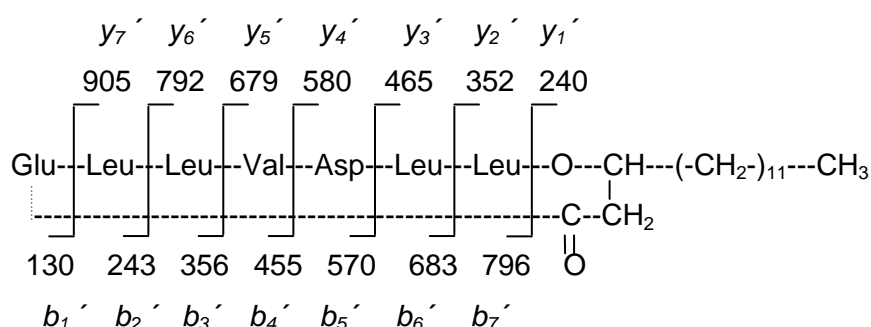
Espectros obtidos para os homólogos produzidos por: **(A)** FS com Okara (24 h), **(B)** FES com Okara (36 h) e **(C)** FES com Okara e espuma de poliuretano (48 h).





Íons esperados da fragmentação do homólogo C₁₃, da Surfactina A. **(A)** Espectro de massa do padrão da surfactina produzido pelo *Bacillus subtilis*; **(B)** Espectro de massa do homólogo C₁₃ produzido por *Bacillus pumilus*.





Íons esperados da fragmentação do homólogo C₁₆, da Surfactina A. **(A)** Espectro de massa do padrão da surfactina produzido pelo *Bacillus subtilis*; **(B)** Espectro de massa do homólogo C₁₆ produzido por *Bacillus pumilus*.

