

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
MESTRADO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

RAPHAELA VASCONCELOS GOMES

**IMOBILIZAÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* EM ESFERAS DE
QUITOSANA OBTIDA DE QUITINA DE CAMARÃO PARA USO NA
BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. VÂNIA MARIA MACIEL MELO

FORTALEZA - CE

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Raphaela Vasconcelos Gomes

**IMOBILIZAÇÃO DE ESPOROS DE *Bacillus subtilis* EM ESFERAS DE
QUITOSANA OBTIDA DE QUITINA DE CAMARÃO PARA USO NA
BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo

Fortaleza

2007

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus maravilhoso e incomparável que me abençoou com tantas conquistas e me deu o privilégio de poder estudar de forma tão minuciosa uma ínfima parte da Sua perfeita Criação.

Aos meus pais, Chagas e Aurilêda, por todo o investimento que fizeram em mim, pelos conselhos, pelo estímulo que me deram, por vibrarem comigo nas minhas vitórias e me ensinarem a aprender com os erros. Obrigada por nunca medirem esforços para que eu tivesse meus momentos de estudo bastante tranquilos e por me liberarem das atividades domésticas enquanto escrevia este trabalho... Obrigada de todo o meu coração, “mami”, por ter me suportado ao longo desses quase inacabáveis dias de redação, no qual eu estava realmente insuportável. E ao senhor “papi”, muitíssimo obrigada pelos maravilhosos almoços que o senhor fez com tanto amor para eu repor as minhas energias e voltar pra frente do computador por horas a fio.

Ao meu noivo (prestes a ser promovido a esposo!), Marcelo, por todo o seu amor, cumplicidade, apoio incondicional, conselhos, paciência, amizade. Obrigada, meu querido, por me entender nestes dias que tivemos que renunciar alguns de nossos momentos para que eu pudesse concluir este trabalho. Obrigada por sempre acreditar que eu posso ir mais além e por tentar me convencer disso quando me encontro desestimulada. E muito obrigada por sempre ter feito investimentos ilimitados na minha vida, me proporcionando condições cada vez melhores para que eu pudesse crescer e me aperfeiçoar na minha carreira.

Aos meus irmãos, Júnior e Genésio, pelos inúmeros momentos de descontração e por sempre torcerem por mim quando nas minhas investidas acadêmicas de me aperfeiçoar na minha área. Obrigada por, mesmo sem entenderem nada do que eu estou falando, ficarem ouvindo eu comentar, toda empolgada, sobre bactérias produtoras de biossurfactantes e acreditarem que um dia eu vou ganhar rios de dinheiro com isso (não seria nada mal...). Vocês são mesmo maravilhosos! Agradeço a Deus por ter me dado dois irmãos. Acho que seria muito difícil conviver com uma irmã numa hora dessas!

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo, pelo exemplo de profissionalismo que significa em minha vida. Pela nossa amizade construída ao longo desses sete (!) anos de convivência, pelas advertências, pelos conselhos, pelo estímulo em prosseguir quando começaram a surgir os primeiros obstáculos, pelos momentos de alegria e descontração, pela paciência, por deixar com que eu “voasse sozinha”, sendo imparcial nos momentos necessários. Esses momentos me trouxeram maturidade! Obrigada! Não posso deixar de lhe agradecer também por, mesmo longe daqui, ter ficado horas comigo na internet discutindo este trabalho. Graças a Deus, algum homem um dia pensou em ligar pessoas tão distantes pela tela de um computador! Essa idéia foi realmente genial...

À profa. Dra. Ana de Fátima Carvalho, por tornar meus dias mais leves e descontraídos. Pelo exemplo de competência e pela amizade. Obrigada por sempre ter disponibilizado o laboratório quando precisei e por ter aceitado o meu convite de participar da banca, mesmo este tendo sido feito tão informalmente.

À profa. Dra. Luciana Gonçalves pela amizade, pela disposição em me ajudar sempre que precisei. Obrigada por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização das análises de HPLC e pela hospitalidade dos seus bolsistas, em especial Valderez Rocha e James Almada. E mais ainda, por ter aceitado o convite para participar da banca.

Ao prof. Dr. Luis Drude de Lacerda, pelo apoio ao longo do curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais e, principalmente, por ter aceitado o convite em representar a minha orientadora na minha banca.

Às profas. Claudia Miranda e Suzana Martins pela agradável convivência, pela amizade, pelos momentos de alegria e orientações valiosas neste início de minha carreira docente.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pelo conhecimento transmitido, pela análise da linhagem bacteriana apresentada neste trabalho e pelo início da parceria tão promissora entre o Laboratório de Citogenética e Genética Molecular e o Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

Aos professores Dr. Paulo Cascon e Dra. Helena Cascon, por permitirem gentilmente a utilização de alguns equipamentos fotográficos.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia: Alysson Lira, Júlio Ximenes, Glauber Melo, Geórgia Colares, Natasha Wanderley, Denise Hissa, Tallita Tavares, por nossa amizade e pelo apoio ao longos desses anos. Em especial, a Simone Lopes, Thatyane Vidal, Genilton Faheina, Niédila Nascimento, Tatiana Nunes e Ruann Janser por terem me ajudado despretensiosamente e com muita dedicação, principalmente, ao final dos meus experimentos, quando eu saía de forma desesperada pelo corredor atrás de doações de placas de Petri esterilizadas... E, com muito carinho, a Vanessa Rodrigues, Fernanda Paes e Lidianne Rocha, minhas grandes amigas tanto das horas mais sérias, quanto dos momentos de falar bobagens. Obrigada por tolerarem minha impaciência nos últimos dias que estive no laboratório e por sempre se disponibilizarem a me ajudar no que eu precisasse, mesmo que fosse só de um ombro pra eu chorar quando estava muito cansada.

Aos estagiários do Laboratório de Fisiologia Animal, em especial ao Davi Farias e Mariana Giovenardi pelo apoio, convivência e amizade.

Ao Daniel Araújo, pela amizade e pelas análises feitas do Laboratório de Cromatografia Gasosa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

À Rivaldina Carmo, técnica de laboratório, por sua alegria, força e carinho; além do cuidado especial e ajuda, na eterna busca de vidrarias limpas e estéreis. Obrigada também pelo seu incomparável café quentinho que me despertava todas as tardes. A sua presença em minha formação foi preciosa; tenha certeza disso!

Ao Valdenor de Oliveira, auxiliar de limpeza, que sempre deixou impecável o ambiente de trabalho, inclusive nos necessários sábados de manhã!

Aos meus alunos da disciplina Microbiologia Geral do semestre 2006.2, que me proporcionaram momentos de muito prazer, ensino e também aprendizado em sala de aula.

A todos os meus colegas da turma de 2005.1 do curso de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais, pelos momentos de crescimento e de estudo sobre as mais diversas áreas que envolvem o ecossistema marinho. Em especial a Tecia Vieira Carvalho, pela amizade e por ter, em nome do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), fornecido a quitosana sem a qual este trabalho não poderia ser realizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Aqüicultura: Considerações Gerais	3
2.2. A carcinicultura na Região Nordeste	4
2.3. Aproveitamento da casca do camarão: produção de quitina e derivados	6
2.4. Propriedades físico-químicas da quitosana	9
2.4.1. <u>Grau de desacetilação</u>	9
2.4.2. <u>Massa Molecular</u>	10
2.4.3. <u>Solubilidade</u>	10
2.5. Atividade antimicrobiana da quitosana	11
2.5.1. <u>Atividade antibacteriana</u>	11
2.5.2. <u>Atividade antifúngica</u>	12
2.6. Aplicações da quitina e da quitosana	13
2.7. Imobilização celular	14
2.7.1. <u>Alginatos</u>	17
2.7.2. <u>Carragenanas</u>	18
2.7.3. <u>Quitosana</u>	19
2.8. O gênero <i>Bacillus</i>	20
2.8.1. <u>Imobilização de esporos bacterianos em quitosana</u>	22
3. OBJETIVO GERAL	23
3.1. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Microrganismo	24
4.2. Quitosana	24
4.3. Avaliação do efeito da quitosana sobre a linhagem selecionada	26

4.3.1. <u>Resistência à ação antimicrobiana da quitosana</u>	26
4.3.2. <u>Pesquisa de quitosanase</u>	26
4.3.2.1. Preparo do Agar Quitosana	26
4.3.2.2. Detecção de quitosanase por difusão em gel	27
4.4. Produção de esporos	27
4.5. Visualização dos esporos	28
4.6. Identificação molecular da linhagem selecionada	28
4.7. Ensaio de germinação dos esporos	29
4.8. Ensaio de adesão bacteriana a hidrocarbonetos	29
4.9. Produção de biossurfactantes	30
4.9.1. <u>Pesquisa e extração de surfactina</u>	30
4.9.2. <u>Medida da tensão superficial</u>	31
4.9.3. <u>Avaliação da atividade emulsificante (E24)</u>	31
4.10. Imobilização dos esporos de <i>Bacillus</i> sp. LAMI007 em quitosana	32
4.11. Biodegradação de n-hexadecano por células livres e imobilizadas	32
4.12. Análises cromatográficas	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Efeito da quitosana sobre a linhagem de <i>Bacillus</i> LAMI007	34
5.2. Produção e visualização dos esporos	35
5.3. Identificação molecular da linhagem LAMI007	36
5.4. Germinação dos esporos na presença de n-hexadecano	37
5.5. Hidrofobicidade de esporos e células de <i>B. subtilis</i> LAMI007	39
5.6. Produção e extração de surfactina	40
5.7. Imobilização dos esporos em quitosana	41
5.8. Biodegradação de n-hexadecano por células livres e imobilizadas	45
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura química da quitina (A) e da celulose (B).	7
Figura 2:	Estrutura química da quitosana.	8
Figura 3:	Ciclo da quitina.	9
Figura 4:	Métodos de imobilização de células microbianas. A. Flocculação; B. Adsorção a superfícies; C. Ligação covalente a carreadores; D. Ligação celular cruzada; E. Encapsulamento; F. Aprisionamento em matriz polimérica.	15
Figura 5:	Estrutura da quitosana reticulada com glutaraldeído.	20
Figura 6:	Processo de esporulação de <i>Bacillus</i> sp.	21
Figura 7:	Aspecto da quitosana em flocos utilizada neste trabalho.	25
Figura 8:	Cultura de <i>Bacillus</i> sp. LAMI007 proveniente da incubação de esporos em gel de quitosana 4 % por 24 h com subcultivo em Agar Nutritivo (1) e controle, crescida previamente em Caldo Nutritivo (2).	34
Figura 9:	Detecção de quitosanase em placa de Agar Quitosana. <i>Bacillus</i> sp. LAMI007 (1), não produtor da enzima e <i>Bacillus</i> sp. LAMI 012 (2), produtor de quitosanase.	34
Figura 10:	Características culturais e morfológicas da linhagem de <i>Bacillus</i> LAMI007. Aspecto colonial (A) em Agar Nutritivo após 24 h de cultivo à temperatura ambiente. Células vegetativas (B) cultivadas em Agar Nutritivo e esporos (C) cultivados em meio indutor de esporulação, por 72 h à temperatura ambiente.	35
Figura 11:	Alinhamento entre as seqüências do rDNA 16S da linhagem LAMI007 (1) e de <i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> linhagem 168 (2).	37
Figura 12:	Aspecto da emulsificação de querosene pela cultura integral de <i>B. subtilis</i> LAMI007 após 48 h (esquerda) e 72 h (direita) de incubação em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano e 1% glucose.	38
Figura 13:	Aspecto da cultura de <i>B. subtilis</i> LAMI007 após 72 h de incubação à temperatura ambiente em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano e 1% glucose.	38
Figura 14:	Aspecto da emulsão O/W (óleo em água) produzida por uma cultura de 72 h de <i>B. subtilis</i> LAMI007 visualizada ao microscópio óptico com aumento de 100x.	39
Figura 15:	Hidrofobicidade de esporos e células vegetativas de <i>B. subtilis</i> LAMI007 na presença de 1% de n-hexadecano.	39

- Figura 16:** Aspecto da cultura de *B. subtilis* LAMI007 em Caldo Surfactina após 48 h de cultivo à temperatura ambiente sob agitação. 40
- Figura 17:** Precipitação da surfactina após tratamento do sobrenadante de uma cultura de 48 h de *B. subtilis* LAMI007 com ácido clorídrico 1N. 40
- Figura 18:** Aspecto da emulsificação de querosene promovido pela cultura integral de *B. subtilis* LAMI007 em Caldo Surfactina (A), pelas células livre de meio (B) e pelo sobrenadante livre de células (C). 41
- Figura 19:** Cromatograma dos sobrenadantes das culturas de *B. subtilis* LAMI007 em Caldo Surfactina contendo 1% glucose (A) e contendo 1% glucose mais 1% de n-hexadecano (B). O pico identificado por (C) se refere à surfactina comercial na concentração de 0,2 mg/mL. 41
- Figura 20:** Aspecto das esferas de quitosana com esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados antes do ensaio de biodegradação (A) e diâmetro das esferas (B). 42
- Figura 21:** Aspecto da cultura de esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados em quitosana em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano no tempo zero (A) e após 48 h de incubação (B). 42
- Figura 22:** Pesquisa de quitosanase em cultura de 24 h (1) e 48 h (2) de *B. subtilis* LAMI007 imobilizada em quitosana e crescida em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano mais 1% de glucose. 43
- Figura 23:** Esferas de quitosana contendo esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados. Controle (A) e reticulada com glutaraldeído 0,3% por 12 h (B). Em (C) esfera reticulada após 24 h de incubação do ensaio de biodegradação de n-hexadecano. 44
- Figura 24:** Aspecto das culturas de esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano mais 1% glucose com 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. Esferas reticuladas com glutaraldeído (1) e esferas não reticuladas (2) (controle). 44
- Figura 25:** Capacidade emulsificante da cultura de *B. subtilis* LAMI007, células e sobrenadante ao longo da biodegradação de 1% de n-hexadecano por células livres e do sobrenadante, por células imobilizadas. 46
- Figura 26:** Perfis cromatográficos de 1% de n-hexadecano extraído do sobrenadante da cultura de *B. subtilis* LAMI007 no tempo zero (A), com 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D) e 96 h (E) do início do ensaio de biodegradação com células livres. 47
- Figura 27:** Perfil cromatográfico de 1% de n-hexadecano extraído do sobrenadante da cultura de *B. subtilis* LAMI007 no tempo zero (A) e com 48 h (B), ou início do ensaio de biodegradação com células imobilizadas. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra bactérias.	12
Tabela 2:	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra fungos.	12
Tabela 3:	Uso estimado de quitosana no ano 2000, em toneladas.	13
Tabela 4:	Exemplos de suportes utilizados em imobilização celular.	17
Tabela 5:	Parâmetros físico-químicos da quitosana utilizada neste trabalho e previamente determinada por Carvalho (2006).	25
Tabela 6:	Condições operacionais do sistema HPLC (Waters, modelo 2487).	31
Tabela 7:	Condições operacionais do sistema GC-MS (Thermo Electro Corporation).	33
Tabela 8:	Parâmetros avaliados durante a biodegradação de 1% de n-hexadecano em meio mineral suplementado com 1% glucose por células de <i>B. subtilis</i> LAMI007 livres.	45
Tabela 9:	Parâmetros avaliados durante a biodegradação de 1% de n-hexadecano em meio mineral suplementado com 1% glucose por células de <i>B. subtilis</i> LAMI007 imobilizadas na forma de esporos em esferas de quitosana reticuladas com 0,3% de glutaraldeído.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC	Associação Brasileira de Criadores de Camarão
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CTAB	Brometo de Cetiltriethylamônio
Da	Daltons
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DO	Densidade Óptica
E24	Percentual de emulsificação com 24 h
EMBL	European Molecular Biology Laboratory.
FAO	Food and Agriculture Organization
GD	Grau de Desacetilação
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
LAMI	Laboratório de Microbiologia e Imunologia
nm	nanômetros
O/W	Óleo em água
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo negativo de uma constante de equilíbrio
ppm	partes por milhão
rRNA 16S	Segmento 16S do RNA ribossomal
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

RESUMO

A utilização de microrganismos ou de seus produtos metabólicos para limpeza de áreas contaminadas por hidrocarbonetos representa uma das vertentes mais estudadas da biorremediação. Entretanto, apesar de muito promissora, esta tecnologia apresenta como principal limitação o fato de, na maioria dos casos, empregar bactérias livres no ambiente, podendo comprometer a eficácia da biodegradação. Nessas circunstâncias, os microrganismos ficam expostos às condições ambientais, podem ser facilmente dispersos do local de aplicação, além de encontrarem resistência da microbiota indígena. A imobilização de bactérias em polímeros minimiza esses problemas por proporcionar um microambiente protegido, além de manter a população microbiana concentrada no local de ação e impedir a competição natural com outros microrganismos. Vários polímeros têm sido pesquisados na tentativa de se desenvolver suportes para imobilização de células. A quitosana, um derivado da quitina encontrada predominantemente na carapaça dos crustáceos, tem sido atualmente estudada por possuir alta densidade de cargas positivas que favorecem a interação com as superfícies celulares de muitos microrganismos. Além disso, pela quitina ser o segundo polímero mais abundante no planeta e o principal subproduto da indústria do camarão, a escolha pelo uso da quitosana também representa uma forma de reciclagem dos resíduos da carcinicultura. Apesar dessas vantagens, os efeitos antimicrobianos da quitosana têm limitado o seu uso, visto serem inúmeros os microrganismos sensíveis a este polímero natural. Um microrganismo para ser imobilizado em matriz exclusivamente de quitosana deve não somente ser resistente aos seus efeitos danosos, mas preferencialmente, é necessário que ele não produza enzimas que degradem a matriz, como quitosanases. Poucos são os microrganismos conhecidos que conseguem preencher estes requisitos, o que explica a escassez de trabalhos que relatem a imobilização de células em suportes exclusivamente de quitosana. Dessa maneira, a relevância deste trabalho encontra-se em dois pontos. Primeiramente em apresentar, de forma inédita, a imobilização de esporos bacterianos de uma linhagem de *Bacillus subtilis* em esferas fabricadas somente por quitosana. E segundo em avaliar, após a germinação dos esporos, a eficiência das células livres e imobilizadas dessa linhagem em biodegradar n-hexadecano. Os resultados mostraram que a imobilização dos esporos foi bastante viável e reprodutível, uma vez que eles resistiram à quitosana, ao drástico tratamento de fabricação das esferas, e germinaram quando na presença de glucose. Os ensaios de biodegradação mostraram que, em ambos os casos, o n-hexadecano foi consumido após 48h de cultivo, numa taxa de 98,74% e 99,51% para células livres e imobilizadas, respectivamente. Apesar das taxas de biodegradação terem sido estatisticamente semelhantes, o uso de *B. subtilis* LAMI007 imobilizado mostrou-se mais vantajoso pelo fato da cultura conseguir biodegradar a mesma concentração de n-hexadecano estando com a biomassa celular dez vezes menor, produzir e liberar a mesma quantidade de biossurfactantes no meio que o observado pelas células livres (em torno de 50%), e também por não utilizar os biossurfactantes produzidos como fonte de carbono, o que facilitou a detecção e seleção dessas substâncias no sobrenadante da cultura. Dessa forma, ficou comprovado ser viável o uso da quitosana na imobilização de esporos da linhagem de *B. subtilis* LAMI007, assim como o potencial dessas células em, uma vez germinadas, serem utilizadas na biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

Palavras-chave: Quitosana, imobilização, esporos, *Bacillus subtilis*, biossurfactantes, biodegradação.

ABSTRACT

The use of microorganisms or their metabolic products for cleaning polluted areas represents one of the most important challenges of bioremediation. However, in spite of very promising, this technology shows as main limitation the use of free microorganisms in the environment, which could fault the effectiveness from biodegradation. In those circumstances, the microorganisms are exposed to environmental conditions and can be easily dispersed from the application site, and find resistance of the indigenous microorganisms. The cells immobilization in polymers minimizes those problems providing environmental protection, maintaining the microbial population concentrated in the action site and preventing the natural competition. Several polymers have been tested in the attempt of developing supports for cells immobilization. The chitosan, a chitin derived found predominantly in the shell of crustaceans, has been studied due to its intrinsic characteristics such as high positive charges density that can interact with the cellular surfaces of many microorganisms. Besides, the chitin is the second most abundant polymer in the world after cellulose. As the main by-product of the industry of the shrimp, the choice of chitosan as immobilization matrix also represents a form of recycling these residues from shrimp culture. In spite of those advantages, the antimicrobial effects of the chitosan have limited its utilization. To be immobilized in chitosan the microorganism has to be not only resistant to harmful effects of chitosan, but preferentially, it is necessary that it doesn't produce enzymes to degrade the polymer, such as chitosanases. Few microorganisms are known to meet that get to fill out these requirements, what explains the shortage of works dealing on immobilization of cells in chitosan. So, the aim of this work was investigate the immobilization of bacterial spores of a *Bacillus* strain in chitosan spheres and evaluating, after the germination of the spores, the efficiency of the cells free or immobilized to degrade n-hexadecane and produce surfactants. The results showed that the immobilization of the spores was quite viable because they resisted to the toxic effect of chitosan and to the drastic treatment of spheres production, although it was necessary supplemented the medium growth with 1% glucose in addition to 1% n-hexadecane for the germination to occur. The results of biodegradation assays showed that, in both cases, with free or immobilized cells, the n-hexadecane was consumed after 48 h of cultivation, with 98.74% and 99.51%, respectively. In spite of the biodegradation percentages be statistically similar the use of *B. subtilis* LAMI007 immobilized was more advantageous since the culture degraded the same n-hexadecane concentration with the biomass ten times smaller. The immobilized cells produced the same amount of surfactants as the free cells (around 50%), but the immobilized cells did not use the surfactants produced as source of carbon. Thus could facilitate the isolation of those substances from the supernatant of the cultures. In conclusion, it was proven to be viable the use of the chitosan in the immobilization of *B. subtilis* LAMI007 spores, as well as the potential of those cells to degrade hydrocarbons and produce surfactant, both results can be applied for decontamination of polluted areas.

Key words: chitosan, immobilization, spores, *Bacillus subtilis*, surfactants, biodegradation.

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes envolvendo derramamento de óleo têm sido cada vez mais frequentes e aumentaram de forma alarmante com o desenvolvimento da indústria petroquímica. Pesquisas revelam que o petróleo e seus derivados representam os poluentes orgânicos recalcitrantes com maior tempo de residência no planeta e conseqüentemente, os responsáveis pelos maiores desequilíbrios ecológicos. Dessa forma, a remediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos encontra-se como um dos principais focos de estudo da ecologia contemporânea.

A limpeza de áreas contaminadas por óleo pode ocorrer por meios físicos, químicos ou biológicos. Atualmente, a biorremediação, tecnologia que utiliza microrganismos ou seus produtos metabólicos para a mineralização de xenobióticos, tem impulsionado pesquisas em vários ramos da ciência. Além de menos dispendiosa que as técnicas convencionais de despoluição química, essa promissora tecnologia permite a mineralização *in situ* dos poluentes, através da biodegradação seriada proporcionada por consórcios microbianos.

Muitos esforços têm sido empregados no sentido de aperfeiçoar as técnicas de biorremediação. Dentre os mais recentes destaca-se o uso de microrganismos imobilizados. A principal vantagem dessa tecnologia encontra-se no melhor monitoramento do metabolismo microbiano e, conseqüentemente, maior estabilidade operacional. Por estarem protegidas contra a ação tóxica do poluente, células imobilizadas são comprovadamente mais eficazes que células livres como agentes nos processos de biodegradação.

Vários polímeros, principalmente os de origem natural, têm sido pesquisados na tentativa de se desenvolver suportes para uso em imobilização celular. A quitina, o biopolímero mais abundante na natureza depois da celulose, é encontrada na carapaça dos crustáceos, no exoesqueleto dos insetos e na parede celular de alguns fungos. A desacetilação alcalina dessa substância origina a quitosana, um heteropolissacarídeo constituído predominantemente por resíduos de β -1,4-D-glucosamina com variados graus de resíduos N-acetilados. Por apresentar alta densidade de grupos protonados em pH ácido, essa substância pode interagir com superfícies celulares de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, as quais são ricas em compostos aniônicos. Essa característica, bastante peculiar, aliada à grande disponibilidade de quitina no ambiente, favorece o uso da quitosana em imobilização celular.

Atualmente, o Ceará ocupa o segundo lugar no ranking nacional da produção de camarão. Entretanto, estudos que forneçam sugestões de aplicabilidade da quitina produzida por essa atividade ainda são escassos no Estado. Pensando nisso, esse trabalho se propõe a contribuir de duas formas. A primeira delas envolve o aproveitamento da quitina residual produzida pela indústria de camarão. A segunda diz respeito ao uso de esporos bacterianos de microrganismos nativos que, imobilizados em esferas de quitosana e adicionados em ambiente favorável, possam germinar e biodegradar os poluentes. Esta proposta, até então inédita, mostrou-se bastante promissora, conforme será apresentada neste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aqüicultura: Considerações Gerais

Aqüicultura é o processo de produção em cativeiro, de organismos que dependem da água para a realização total ou parcial de seu ciclo de vida, em qualquer estágio de desenvolvimento. Esta atividade é um dos segmentos econômicos que tem crescido substancialmente nos últimos anos. Dentro do segmento da aqüicultura, o cultivo do camarão marinho em cativeiro tem-se destacado em todo mundo, em especial no Brasil, como o carro-chefe do desenvolvimento deste segmento, uma vez que as condições climáticas e hidrobiológicas são favoráveis à exploração e difusão dessa atividade econômica no país (ROCHA, 2002). De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO), três fatores caracterizam essa atividade: o organismo produzido é aquícola, existe um manejo visando à produção, e a criação possui um proprietário, isto é, não é um bem coletivo como são as populações exploradas pela pesca. Muitas são as espécies de peixes, crustáceos, moluscos e algas cultivadas em cativeiro que são comercializados no mercado, como por exemplo, carpa, salmão, camarões, mexilhões, ostras e algas marinhas. O declínio acentuado dos produtos provenientes da pesca extrativa e a grande demanda do mercado internacional para os produtos oriundos da aqüicultura, principalmente pelo camarão, fazem desta atividade uma das mais promissoras do setor primário da economia (ROCHA, 2003).

A pesca de camarão é uma atividade de produção primária, dependente de fatores econômicos, sociais e ambientais, praticada nos ecossistemas marinhos, estuarinos ou de água doce. O Brasil, por possuir vasto litoral e grande potencial hídrico, com várias bacias hidrográficas, além de uma grande biodiversidade de fauna marinha, possui grande potencial pesqueiro de camarões, sendo a produção brasileira de camarão por captura estimada em cerca de 63 mil toneladas anuais (REVISTA ABCC, 2005). Porém, seguindo a tendência mundial, a produção de camarão por captura está em declínio no Brasil, enquanto a carcinicultura, produção do camarão em cativeiro, tem aumentado (BNDES, 2006). As dificuldades de abastecer a demanda mundial de animais marinhos apenas com a pesca é a principal razão do crescimento do cultivo em cativeiro destes animais (aqüicultura).

A carcinicultura, ou o cultivo de crustáceos, é uma atividade em franca expansão no Brasil. Esta atividade desenvolveu-se principalmente a partir da década de 80, sendo que apresentou um crescimento de mais de 20% entre os anos de 1985 a 1990. Esse crescimento

continuou e a produção passou de 758 mil toneladas (renda aproximada de US\$ 4,5 bilhões), em 1990, para 1,9 milhões de toneladas (US\$ 11,5 bilhões), em 2001 (BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003). As principais razões para o rápido crescimento mundial do cultivo de camarão marinho em cativeiro estão na demanda crescente por esse produto no mercado externo, na elevada rentabilidade distribuída em toda sua cadeia produtiva e na capacidade de gerar renda e emprego proporcionando assim, desenvolvimento socioeconômico regional (ROCHA, 2003; REVISTA ABCC, 2003).

O cultivo do camarão marinho é uma atividade econômica do setor primário que se desenvolve de forma atípica em comparação às outras atividades do setor agropecuário regional, uma vez que independe de chuvas e pode ser produzido de forma ininterrupta durante todo o ano. É praticado em mais de cinquenta países em todo o mundo e adapta-se melhor às regiões de clima tropical e subtropical dos países emergentes, sendo melhor representado pelo continente asiático (FROTA, 2005).

No ano 2003, o setor produtivo da carcinicultura no Brasil obteve uma produtividade média de 6.084 kg/ha/ano e, em 2004, revelou 7.059 kg por hectare produzido, parâmetro bastante elevado, considerado um dos maiores dentre os concorrentes internacionais, e por isso o Brasil assumiu a liderança mundial em produtividade do setor (ROCHA, 2003; REVISTA ABCC, 2004). A participação do camarão cultivado no Brasil no mercado internacional vem crescendo e se consolidando como um produto altamente competitivo. Na atualidade, mais de 90% do camarão brasileiro é exportado para países como Estados Unidos, Espanha e França e consistem principalmente de matérias-primas básicas, como o camarão em bloco congelado, sem e com cabeça, e cerca de 60% das importações americanas de camarão são de produtos com valor agregado (FROTA, 2005).

2.2. A carcinicultura na Região Nordeste

A carcinicultura no Brasil, orientada para a produção comercial, iniciou-se na década de 70, com uma espécie exótica, *Penaeus japonicus*, por iniciativa do Governo do Rio Grande do Norte como alternativa econômica para as salinas desativadas. A década de 80 foi marcada pelas inúmeras tentativas de adaptação de algumas espécies de camarão nos viveiros nordestinos, falta de financiamento e inexistência de tecnologias adequadas. Somente em 1996, com o cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei*, juntamente com a disponibilização de

ração de boa qualidade e domínio do ciclo de reprodução pelos laboratórios nacionais, é que o Brasil começou a expandir sua produção de camarão marinho, que atualmente apresenta uma taxa anual de crescimento de áreas de viveiros de 30% e 50% na produção (BRASIL, 2001; VEJA, 2004).

A região Nordeste é a maior produtora de camarão de cultivo. Acrescenta-se que em 2003, 95,2 % da produção de camarão resultou dos viveiros do Nordeste (85,8 toneladas). Os outros 4,8% da produção de camarão no país, que representam 4.338 toneladas produzidas, vêm dos estados do Pará, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (REVISTA ABCC, 2004).

A região Nordeste combina aspectos estratégicos fundamentais que justificam o seu potencial de exploração da carcinicultura. O potencial dos recursos naturais vem associado à vantagem comparativa oferecida pelas excepcionais condições ecológicas, como por exemplo, temperatura média anual adequada aos mais diversos tipos de cultivos, inexistência de invernos prolongados, possibilitando vários ciclos de cultivos durante o ano, maiores taxas anuais de luminosidade, e áreas apropriadas disponíveis não urbanizadas. Nas zonas adjacentes aos manguezais da faixa que se estende do sul da Bahia ao Norte do Maranhão, onde a produção agrícola é limitada ou inexistente pelas condições de solos arenosos e água salobra, o cultivo do camarão marinho se apresenta como uma das raras alternativas econômicas capazes de gerar renda e emprego e modificar o quadro de pobreza rural que predomina nessas zonas (REVISTA ABCC, 2003).

O camarão cultivado se consolida na liderança das exportações do setor pesqueiro nacional e demonstra que pode contribuir para ampliar os superávits da balança comercial, captando divisas essenciais para fortalecer a posição financeira do Brasil no âmbito internacional (FROTA, 2005).

Os principais países produtores de camarão em cativeiro estão localizados no hemisfério oriental. Em 2005, a China, maior produtor mundial de camarão, produziu 408.000 toneladas numa área de 300.000, o Brasil produziu 65.000 toneladas em 15.000 hectares de área, resultando numa produtividade de 4.333 kg/ha/ano, contra 1.360 kg/ha/ano da China. Apesar de o Brasil ter uma área de produção pequena em relação aos maiores produtores de camarão, apresenta elevada produtividade. Este quadro revela o potencial de crescimento do mercado da carcinicultura em nosso país (BNDES, 2006).

O principal produtor do país é o Estado do Rio Grande do Norte, tendo produzido em 2002 um total de 18.500 toneladas, o que garantiu a este estado 30,77% da produção nacional. O Estado do Ceará vem logo em seguida, tendo produzido em 2002 um total de 16.383 toneladas, o que representa, em percentual, um total de 27,25%.

O rápido crescimento mundial do cultivo do camarão marinho nas últimas duas décadas, notadamente nos países costeiros tropicais emergentes da Ásia e das Américas, teve e continua tendo por base de sustentação, a crescente demanda do produto no mercado internacional, o atrativo nível de rentabilidade do agronegócio e a sua capacidade de gerar renda, emprego e divisas para o desenvolvimento dos países produtores (REVISTA ABCC, 2004).

Os principais mercados consumidores do camarão cultivado no Brasil são: Estados Unidos, Europa, com destaque para Portugal, França e Espanha, e o Japão. A carcinicultura, mesmo sendo uma atividade comercial recente no Brasil, já é o segundo item da pasta das exportações do setor primário da economia nordestina, tendo respondido em 2002 por cerca de 96,48% da produção nacional de camarão cultivado.

Essa atividade representa uma opção capaz de contribuir para o aumento da oferta protéica de baixo custo e mais saudável para a população, aumento do emprego rural (evitando o êxodo), melhor distribuição de renda, redução da mortalidade infantil, oferece condições mais adequadas de convivência com a seca no semi-árido do Nordeste, serve como fonte adicional de renda através de consórcio, com a criação de outros animais e cultivos, em áreas irrigadas e regiões consideradas marginais para a produção econômica agrícola e para outros usos. Embora se saiba dos riscos de impactos ambientais que a carcinicultura pode provocar quando praticada de forma inadequada, é possível orientar a exploração racional do potencial da aquíicultura e dos recursos pesqueiros para uma combinação inteligente de objetivos econômicos com a conservação destes recursos.

2.3. Aproveitamento da casca do camarão: produção de quitina e derivados

No aspecto econômico a utilidade do camarão vai além da indústria de alimento, é útil nas indústrias química, aeronáutica e médica/farmacêutica. Na natureza, o crustáceo está presente em diversas cadeias alimentares, além de ter uma importante função ao absorver detritos e matéria orgânica em decomposição. Para a culinária, o camarão fornece a cauda, que representa de 40% a 60% do total do corpo. Cabeça, casca e apêndices (subprodutos do

camarão), hoje também encontram utilidades. Com a cabeça, é fabricada a farinha de camarão. Da quitina que forma a casca, é extraído um material para a fabricação de colas altamente resistentes, utilizadas pela indústria aeronáutica e material odontológico de alta precisão, dentre outros produtos (KRAJEWSKA, 2004).

A quitina é um homopolissacarídeo linear composto por unidades 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glucose (95%) e 2-amino-2-deoxi- β -D-glucose (5%) ligados através de ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Foi isolada pela primeira vez em 1811 por Braconnot e denominada fungina por ter sido extraída de fungos. Em 1823, Odier isolou o mesmo polímero do élitro de besouros, após tratamento com solução aquecida de KOH, e denominou-o de quitina (do grego, *chítón*) que significa túnica, cobertura (ROBERTS, 1992).

Comparada à celulose, esses dois polímeros possuem estrutura química bastante semelhante. A única diferença é a substituição dos grupos hidroxila, em C-2 na celulose, por grupos amino acetilados na quitina (Figura 1). Estes, por sua vez, são exclusivamente responsáveis pelos 6,9% de nitrogênio presentes na molécula, calculados a partir de sua estequiometria $(C_8H_{13}O_5N)_n$ (ROBERTS, 1992; NELSON; COX, 2004). Essa similaridade é refletida no papel estrutural que a celulose e a quitina exercem, respectivamente, na parede celular dos vegetais e no exoesqueleto dos crustáceos e insetos, além da parede celular de vários fungos (ROBERTS, 1992). Depois da celulose, a quitina é considerada o polímero mais abundante na natureza, com milhões de toneladas produzidas anualmente. As fontes comerciais e tradicionais de quitina são casca de siri, camarão e lagosta que são subproduto da indústria de beneficiamento de pescado (KURITA, 2001).

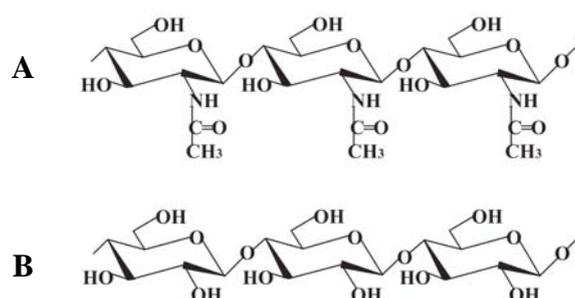


Figura 1: Estrutura química da quitina (A) e da celulose (B) (KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana (Figura 2), descrita pela primeira vez em 1859 por Rouget, é um polímero linear composto de unidades 2-amino-2-deoxi- β -D-glucose (60~100%) e 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glucose (0~50%), derivado da desacetilação da quitina. Essa reação

pode ser de natureza química, quando realizada com bases fortes como NaOH ou de natureza biológica, através de enzimas microbianas denominadas quitinases ou quitina desacetilases. (ROBERTS, 1992; SOMASHEKAR; JOSEPH, 1996; KRAJEWSKA, 2004). O método mais empregado para obtenção de quitosana envolve a reação de desacetilação da quitina com NaOH 40% à 120 °C por cerca de 3 horas. Para se produzir 1 Kg de quitosana com grau de desacetilação de 70%, a partir de casca de camarão, são necessários 6,3 Kg de HCl, 1,8 Kg de NaOH e aproximadamente 1.400 L de água. O rendimento da quitina é de aproximadamente 10% em termos de resíduo seco de cascas de crustáceos (KUMAR, 2000; GILDBERG; STEMBERG, 2001).

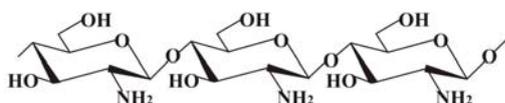


Figura 2: Estrutura química da quitosana (KRAJEWSKA, 2004).

Embora a literatura aborde quitina e quitosana como cadeias polissacarídicas únicas, esses carboidratos raramente estão isolados de outros compostos na natureza. A quitina existente no exoesqueleto dos crustáceos forma um complexo com proteínas e sais de carbonato de cálcio e, no caso dos insetos, liga-se ainda a hidroxifenóis (ROBERTS, 1992). Dessa forma, antes da etapa de desacetilação propriamente dita, a quitina passa por outros processos que envolvem desproteinização em NaOH diluído, descalcificação em HCl diluído e despigmentação em acetona. Posteriormente, a desacetilação é realizada em solução de NaOH 40-50% (KRAJEWSKA, 2004).

No caso do tratamento biológico, a enzima quitina desacetilase, produzida principalmente pelo fungo *Mucor rouxii*, é a responsável pela formação da quitosana a partir da quitina (KAFETZOPOULOS; MARTINO; BOURIOTIS, 1993). Entretanto, para que a quitina e a quitosana sejam biodegradadas sem acúmulo excessivo na natureza, outras três enzimas – quitinase, quitosanase e N-acetil- β -D-glicosaminidase – atuam em sinergia, até a redução dos polímeros às unidades monoméricas constituintes, caracterizando o ciclo da quitina representado na Figura 3 (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999). Dentre as bactérias produtoras de quitosanases, destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, enquanto que o gênero *Aspergillus* tem sido o mais citado dentre os fungos (CHENG; LI, 2000). Além disso, essas enzimas podem ser encontradas nos vegetais, envolvidas no

mecanismo de defesa contra microrganismos fitopatogênicos (SOMASHEKAR; JOSEPH, 1996).

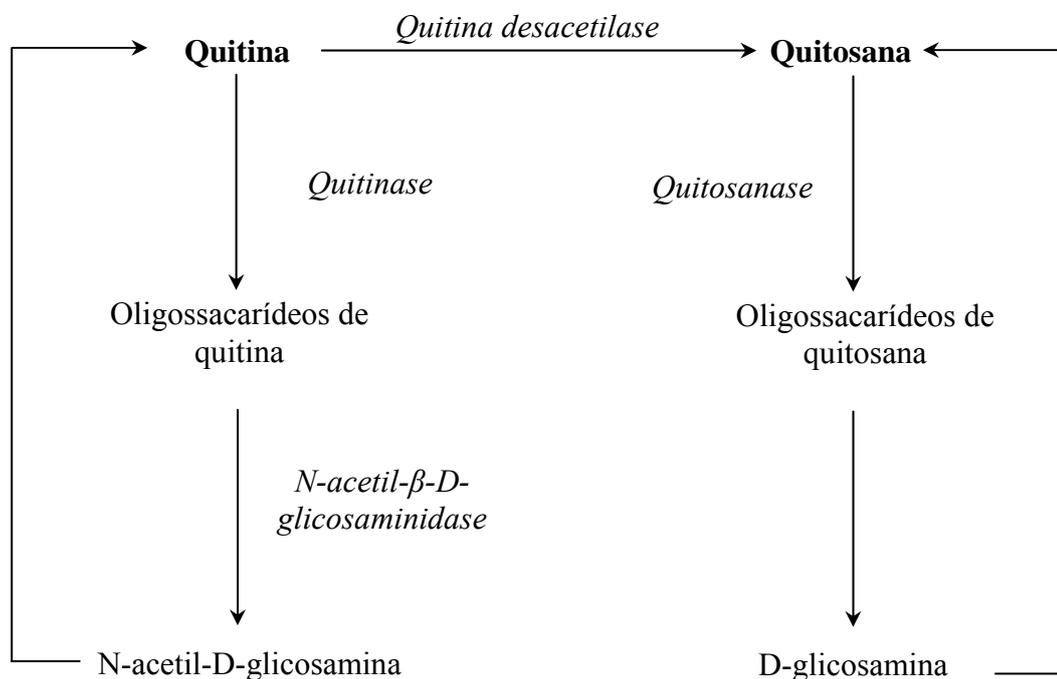


Figura 3: Ciclo da quitina (segundo CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999).

2.4. Propriedades físico-químicas da quitosana

2.4.1. Grau de desacetilação

A desacetilação da quitina é a etapa de maior importância durante a síntese de quitosana. A remoção dos grupos acetil libera grupamentos amínicos reativos, os quais serão responsáveis, posteriormente, por definir não somente a identidade química da quitosana, mas também determinar sua aplicabilidade biológica (GOOSEN, 1997). Como exemplo de trabalhos que avaliaram a variação das respostas biológicas devido a diferentes graus de desacetilação podemos citar Tolaimate et al. (2000) e Zheng e Zhu (2003). O grau de desacetilação (GD) da quitosana depende das características da quitina que lhe deu origem e dos métodos químicos ou biológicos utilizados no processo de purificação. As principais técnicas para determinar essa característica envolvem espectroscopia na região do

infravermelho e do ultravioleta, cromatografia gasosa e titulometria (TAN et al., 1998; NO; LEE; MEYERS, 2000).

2.4.2. Massa Molecular

Assim como o grau de desacetilação, a massa molecular da quitosana é bastante variável e depende diretamente da origem e do processamento da quitina. A massa molecular da quitina natural é freqüentemente maior que 1×10^6 Da, enquanto que a da quitosana comercial fica em torno de 1×10^5 Da, dependendo das condições de produção (ROBERTS, 1992).

A importância da massa molecular é demonstrada em vários estudos que focalizam a aplicação farmacêutica da quitosana. Pesquisas mostram que, para esta finalidade, torna-se interessante o desenvolvimento de polímeros de baixa massa molecular (SATO; ISHII; OKAHATA, 2001). Os métodos de despolimerização da quitosana com redução das cadeias poliméricas envolvem degradação enzimática, degradação oxidativa, clivagem ácida e degradação ultrasônica (MAO et al., 2004).

2.4.3. Solubilidade

Enquanto a quitina é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, seu derivado desacetilado é facilmente solúvel em soluções ácidas diluídas (ácido acético, fórmico, láctico), na faixa de pH entre 2,0 e 6,0, como também em ácido hidrolórico (CHATELET; DAMOUR; DOMART, 2001; RABEA et al., 2003). A dissolução em ácido acético 1% pH 4.0 tem sido citada comumente na literatura. Entretanto, soluções concentradas desse ácido, em altas temperaturas, podem causar a despolimerização da quitosana. Em se tratando de soluções inorgânicas, a solubilidade diminui. Na presença de ácido sulfúrico ou de ácido clorídrico, este polímero não se dissolve (GOOSEN, 1997).

A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e, conseqüentemente, maior a solvatação em água (SANTOS et al., 2003). Em pKa em torno de 6,3 a quitosana encontra-se naturalmente carregada e pronta para reagir com outros compostos (SCHULZ et al., 1998).

2.5. Atividade antimicrobiana da quitosana

A quitosana apresenta maior espectro de ação antimicrobiano que a quitina. Segundo Gil et al. (2004), essa diferença deve-se ao maior número de aminas livres presentes na quitosana, as quais podem interagir fortemente com resíduos negativos da superfície celular, inibindo o crescimento microbiano.

De acordo com Lim e Hudson (2003) os fatores que afetam diretamente a atividade antimicrobiana da quitosana são o grau de desacetilação, a massa molecular, o pH e a temperatura. Essas variáveis atuam modificando a estrutura química do polímero e, conseqüentemente, o potencial de ligação às membranas celulares.

2.5.1. Atividade antibacteriana

Vários mecanismos de atividade antibacteriana da quitosana já foram sugeridos, entretanto, ainda não se conhece completamente a forma exata de ação desse polímero. Dentre os mecanismos propostos, o mais aceito se refere às interações entre cargas positivas da quitosana com moléculas aniônicas da superfície celular. Essa ligação provoca alterações vitais na permeabilidade da membrana e compromete o metabolismo microbiano, podendo, inclusive, levar à lise da célula (LIM; HUDSON, 2003; LIU et al., 2004).

Nos últimos anos, alguns estudos têm sido realizados a fim de se determinar o potencial de inibição de crescimento microbiano pela quitosana. A literatura mostra que esse biopolímero apresenta um largo espectro de ação, superando a de alguns agentes químicos (Tabela 1). Em geral, bactérias Gram-positivas apresentam maior sensibilidade à quitosana de elevada massa molecular. O contrário vale para Gram-negativas que podem ser inibidas pela alteração no metabolismo, provocada pela entrada do polímero de baixa massa molecular através da membrana plasmática (ZHENG; ZHU, 2003). Alguns autores afirmam que essa sensibilidade está diretamente relacionada à quantidade de moléculas aniônicas na superfície celular, o que justifica o fato de bactérias Gram-negativas serem geralmente mais susceptíveis (CHUNG et al., 2004; LIU et al., 2004). Por apresentar baixa toxicidade em mamíferos, o potencial antimicrobiano da quitosana tem sido bastante explorado (RABEA et al., 2003; LIU et al., 2004).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra bactérias (RABEA et al., 2003).

Bactéria	Reação de Gram	CIM (ppm)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	100
<i>Bacillus cereus</i>	+	1000
<i>Corynebacterium michiganense</i>	+	10
<i>Erwinia sp.</i>	-	500
<i>Erwinia carotovora subsp.</i>	-	200
<i>Escherichia coli</i>	-	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	700
<i>Micrococcus luteus</i>	+	20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	20
<i>Xanthomonas campestris</i>	-	500

2.5.2. Atividade antifúngica

O potencial antifúngico da quitosana tem sido estudado para o tratamento de fitopatologias causadas por fungos presentes no solo. O interesse nesse tipo de estudo reside no fato da quitosana inibir o crescimento da maioria dos microrganismos resistentes aos fungicidas (LIM; HUDSON, 2003). Rabea et al. (2003) descrevem que quitosana na concentração de 1 mg/mL inibiu o crescimento de vários fungos, com exceção dos zigomicetos (Tabela 2). Este grupo apresenta o biopolímero como principal constituinte da parede celular.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) de quitosana contra fungos (RABEA et al., 2003).

Fungo	CIM (ppm)
<i>Botrytis cinerea</i>	10
<i>Fusarium oxysporum</i>	100
<i>Dreschtera sorokiana</i>	10
<i>Micronectriella nivalis</i>	10
<i>Piricularia oryzae</i>	5000
<i>Rhizoctonia solani</i>	1000
<i>Trichophyton equinum</i>	2500

2.6. Aplicações da quitina e da quitosana

Atualmente, muitas são as possíveis aplicações de quitina e seus derivados, devido à sua versatilidade. Produtos à base desses polímeros podem ser utilizados na indústria alimentícia e de cosméticos, na agricultura e no tratamento de efluentes, sendo empregados como agentes quelantes de metais, como floclulantes, como adsorventes de corantes, adsorventes de ânions metálicos e outros, e esta tecnologia já é explorada em várias partes do mundo, conforme pode ser observado na Tabela 3. Devido sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofílicidade, propriedades antibacterianas e bioatividade, a quitosana, por exemplo, pode ser usada até como biomaterial, na forma de vesículas para liberação lenta de drogas. A lista de aplicações de quitina e quitosana é ainda mais extensa quando são incluídos os vários derivativos de quitosana obtidos por meio de reações químicas através das quais são inseridos diferentes grupos funcionais às suas moléculas, conferindo diferentes propriedades e aplicações (GAMZAZADE; NASIBOV; ROGOZHIN, 1997; HUANG; CHEN; PAN, 2000; KUMAR, 2000; SCHMUHL; KRIEG, 2001; GUIBAL; VINCENT; SPINELLI, 2005).

Tabela 3: Uso estimado de quitosana no ano 2000, em toneladas (KURITA, 2006).

Mercado	América do Norte	Europa	Ásia	Outros	Total
Nutricional	500	125	250	125	1000
Floculação (tratamento de água)	125	25	200	50	400
Alimentos (preservação)	0	0	125	25	150
Produção de oligossacarídeos	0	0	150	0	150
Agricultura	25	0	75	25	125
Cosméticos	25	25	50	0	100
Têxtil	0	0	50	0	50
Fabricação de papel	25	0	25	0	50
Ração animal	10	0	25	10	45
Medicamentos	1	1	1	0	3
Total	711	176	951	235	2073

Os resíduos do processamento do camarão também contêm consideráveis quantidades de proteínas e astaxantina, um pigmento carotenóide essencial para o cultivo em cativeiro de salmões, ao ser incorporado na ração, para se obter um peixe mais avermelhado.

Além deste uso, este pigmento natural também é utilizado na avicultura para a produção de ovos e carne de frango mais avermelhados e também em medicamentos e cosméticos, devido a sua alta atividade antioxidante (FONTANA et al., 2000). Tal pigmento também é encontrado em algas microscópicas, na levedura vermelha *Phaffia rhodozyma* e em animais aquáticos, porém praticamente todo o produto em circulação no mercado provém da produção sintética, não sendo este, entretanto, totalmente igual ao encontrado na natureza, pois possui atividade e estabilidade inferiores. O preço do produto gira em torno dos US\$ 2500 kg⁻¹ e o mercado mundial foi estimado em US\$ 200 milhões (LORENZ; CYSEWSKI, 2000). Assim, a recuperação de astaxantina do resíduo do processamento do camarão poderia ser de grande interesse para a viabilidade econômica da produção industrial de quitina.

Além das aplicações anteriormente citadas, tem-se explorado a capacidade quelante da quitosana para captura de metais e compostos aromáticos, como o fenol, em tratamentos de efluentes. A afinidade por metais, intrínseca a esse biopolímero, provém do grande número de grupos amino na molécula e depende do pH, do tempo e da temperatura nos quais as reações ocorrem. Essa propriedade pode ser explorada para a recuperação de contaminantes metálicos de resíduos industriais (DUTTA; RAVIKUMAR; DUTTA, 2003; CRINI, 2005; GUIBAL, 2005; CARVALHO, 2006; VIEIRA; BEPPU, 2006).

Uma das mais recentes linhas de pesquisa sobre quitosana diz respeito ao desenvolvimento de suportes para imobilização de células, fármacos e biomoléculas. Neste contexto, o polímero é utilizado como matéria-prima no desenvolvimento de membranas, filtros e microesferas, os quais podem ser utilizados em diversos ramos da biotecnologia (GUIBAL; VINCENT; SPINELLI, 2005).

2.7. Imobilização celular

Imobilização é um termo geral utilizado para descrever diferentes formas de fixação de células ou moléculas em suportes poliméricos. As formas de imobilização incluem floculação, adsorção a superfícies, ligação covalente a carreadores, ligação cruzada entre células, encapsulamento e aprisionamento em matrizes (Figura 4). Dentre os métodos anteriormente citados, o encapsulamento tem emergido com sucesso, por garantir maior proteção às variações ambientais e viabilidade dos agentes microbianos (WOODWARD, 1988; CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). Neste processo, as células microbianas ficam

aprisionadas no interior de uma matriz polimérica, a qual possui poros de tamanho suficiente para permitir a difusão do substrato em direção às células, assim como dos produtos gerados pelo metabolismo celular para fora da matriz (JIANLONG; YI, 1999). A técnica de encapsulamento, portanto, foi escolhida neste trabalho durante os experimentos de imobilização celular.

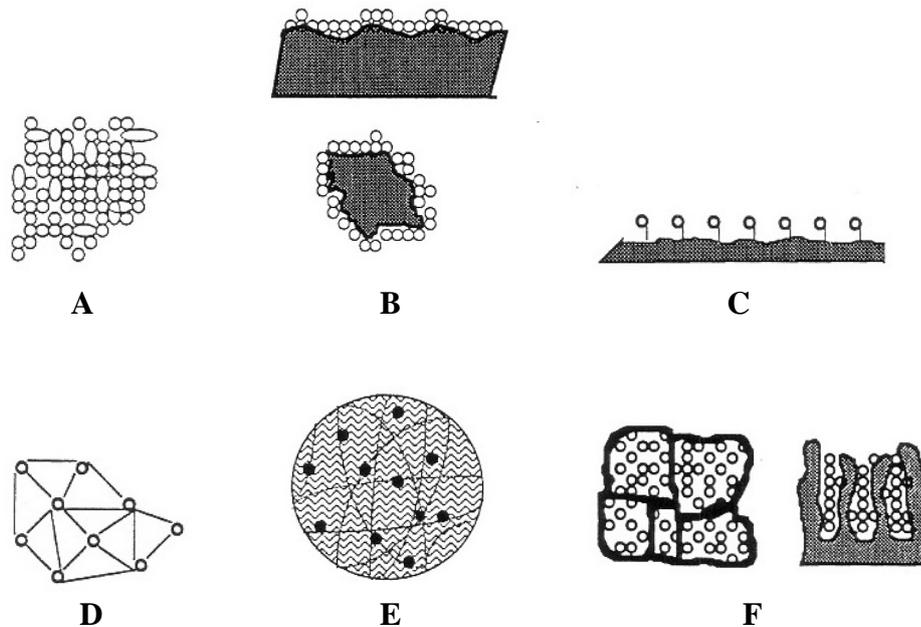


Figura 4: Métodos de imobilização de células microbianas. **A.** Flocculação; **B.** Adsorção a superfícies; **C.** Ligação covalente a carreadores; **D.** Ligação celular cruzada; **E.** Encapsulamento; **F.** Aprisionamento em matriz polimérica (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996).

Dentre as diversas aplicações de células imobilizadas, podemos citar a utilização desta tecnologia na indústria alimentícia e farmacêutica, na medicina, no biocontrole da agricultura, na remoção de metais de efluentes e na biorremediação de xenobióticos presentes em solos contaminados. Além disso, algumas técnicas de imobilização viabilizam estudos com microrganismos extremófilos, permitindo que sobrevivam em ambientes estressantes ao seu metabolismo (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996).

Estudos mostram que microrganismos imobilizados são mais eficazes como agentes biodegradadores que células livres. Essa vantagem provém da proteção fornecida pelo suporte

de imobilização contra a toxicidade dos poluentes, otimizando a produção de metabólitos microbianos responsáveis pelas reações de mineralização dos xenobióticos (JIALONG et al., 2001). Williams e Munnecke (1981), em sua pesquisa sobre produção de etanol por leveduras imobilizadas, concluíram que o uso de sistemas com células imobilizadas surgiu como uma alternativa viável para se elevar a produtividade de substâncias de origem microbiológica. Isso porque em sistemas com células imobilizadas foi possível obter maior massa de células por unidade de volume comparado a sistemas que utilizam células livres.

A técnica de encapsulamento celular pode ser realizada pelo envolvimento dos componentes biológicos em uma membrana semipermeável, sendo similar ao método de aprisionamento em que as enzimas/células estão livres na solução, mas restritas no espaço. Proteínas ou enzimas, que são moléculas grandes não podem sair da cápsula, mas substratos e produtos pequenos podem passar livremente através da membrana semipermeável. Muitos materiais podem ser usados para construir uma microcápsula variando de 10-100 μm em diâmetro (BICKERSTAFF, 1997).

Os suportes utilizados para a imobilização são, em sua maioria, insolúveis em água e possuem alta massa molecular. Para ser considerada ideal para imobilização de células microbianas, a matriz polimérica deve reunir algumas características, tais como não ser tóxica para as células, ter elevada capacidade de retenção dos microrganismos, ser inerte química e bioquimicamente, ter resistência mecânica e alta difusividade de reagentes e produtos formados, para minimizar os efeitos do transporte de massa no processo (WANG; QIAN, 1999).

Muitos polímeros têm sido utilizados como suporte para imobilização celular (Tabela 4). Polissacarídeos de algas como agar, agarose, alginatos e carragenanas são classificados como polímeros naturais, enquanto poliacrilamida, poliestireno, poliuretano e alumina, como polímeros sintéticos (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996). O uso dos polímeros naturais pode ser na forma de matrizes homogêneas ou condensados com outros reagentes, como glutaraldeído. A preferência pelo uso desses polissacarídeos reside no fato deles serem abundantes na natureza, economicamente viáveis e apresentarem baixa toxicidade, quando comparados aos de origem sintética (DIAS; REZENDE; LINARDI, 2000; JIALONG et al., 2001; CRINI, 2005).

Embora diversos trabalhos já tenham sido publicados exemplificando a utilização de alginatos e carragenanas para imobilização de células, pouco ainda foi relatado sobre o uso da

quitosana. Esta tecnologia ainda é recente e encontra-se em estudo para o desenvolvimento de membranas, filtros e microesferas, os quais podem ser utilizados em diversos ramos da biotecnologia (KRAJEWSKA, 2004).

Tabela 4: Exemplos de suportes utilizados em imobilização celular (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Suporte	Microrganismo	Referência
Alginato	<i>Candida tropicalis</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JAMAI et al. (2001)
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	BECERRA et al. (2001)
	<i>Candida guilhermondii</i>	CARVALHO et al. (2005)
Carragenana	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NIGAM (2000)
	<i>Pseudomonas dacunhae</i>	CAHK et al. (1999)
	<i>Escherichia coli</i>	LENG; ZHENG; SUN (2006)
Poliacrilamida	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SIESS; DIVIES (1981) NOROUZIAN et al. (2003)
	<i>Saccharomyces uvarum</i>	PUNDLE; PRABHUME; SIVARAMAN (1988)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HAMDY; KIM; RUDTKE (1990) BORENSTEIN (2003)
Alumina	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MOUEDDEB et al. (1996)
	Bactérias redutoras de sulfato	SILVA et al. (2006)
	Leveduras	KOURKOUTAS et al. (2006)

2.7.1. Alginatos

Os alginatos, polímeros lineares constituídos por ligações β (1,4)-D-ácido manurônico e α (1,4)-L-ácido gulurônico, são produzidos principalmente por algas marrons, como *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *L. hyperborea* e *Eklonia cava*, mas também podem ser sintetizados por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azobacter* (FETT; WIJEY, 1995). A diferença existente nessa família de polímeros encontra-se na composição monomérica, no arranjo e no tamanho da cadeia.

Na presença de íons Ca^{+2} , os grupamentos poligulurônicos dos alginatos formam ligações cruzadas entre si através de um processo conhecido como quelação iônica. Essas ligações químicas promovem o rearranjo das cadeias lineares, formando uma rede tridimensional, unidade básica dos géis poliméricos. Estes, por sua vez, serão mais fortes mecanicamente quanto maior for a concentração de monômeros α (1,4)-L-ácido gulurônico da cadeia original (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996).

O processo de quelação nos alginatos independe da temperatura, podendo ocorrer entre a ampla faixa de 0 °C e 80 °C. Para formação de esferas, a concentração de alginato de sódio em água varia entre 1 e 8 % (m/v). No caso de encapsulamento celular, a suspensão formada pelas células e o gel deve ser gotejada em uma solução cuja concentração de alginato de sódio esteja entre 0,05 e 2 % (m/v). A ligação iônica entre as cadeias lineares do polímero e os íons Ca^{+2} ocorre de forma imediata, originando uma rede polimérica na qual as células são aprisionadas (GILSON; THOMAS; HAWKES, 1990).

Vantagens como grande disponibilidade no mercado, possibilidade de ampliação da escala de produção e a aceitação das substâncias utilizadas (alginato e cloreto de cálcio) como aditivos na produção de alimentos, têm sido citadas na literatura (CHAMPGNE; BLAHUTA; GAGNON, 2000). Por outro lado, este polímero apresenta elevada instabilidade química na presença de agentes quelantes do íon cálcio, tendência das esferas em sofrer dilatação na presença de cátions monovalentes, além das limitações relacionadas à transferência de substratos e produtos, o que dificulta o uso do alginato como suporte imobilizante em determinados processos (FREEMAN; LILLY, 1998).

2.7.2. Carragenanas

As carragenanas são encontradas nas algas vermelhas, principalmente nas espécies *Chondrus crispus*, *Eucheuma cottonii*, *Gigartina stellata* e *G. radula*. Esses polímeros são classificados de acordo com seu arranjo molecular em ι , λ e κ -carragenana, sendo este último o mais abundante na natureza. Os monômeros constituintes desse polissacarídeo são β (1,3)-D-galactose e α (1,4)-D-galactose. A diferença entre as cadeias encontra-se no tamanho e no sítio de sulfonação (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996; DESAI; DAVE; DEVI, 2004). Este polissacarídeo tem a particularidade de formar géis em meios aquosos a concentrações muito baixas (CREDIDIO, 2006).

O encapsulamento celular em esferas de carragenana ocorre mediante temperatura controlada e na presença de íons K^+ ou Al^{3+} . Para tanto, uma solução de 2 a 5 % de carragenana deve ser aquecida a 80 °C. Após resfriamento a 42 °C, adiciona-se a suspensão celular também aquecida entre 40 e 50 °C. A mistura deve ser gotejada em uma solução de KCl 0,2 M para imobilização das células (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996).

A principal desvantagem do uso da carragenana em técnicas de imobilização reside no aquecimento ao qual a suspensão celular deve ser submetida. A temperatura elevada pode causar não somente a inativação irreversível de algumas enzimas, mas a morte das células (VORLOP; KLEIN, 1987; JIALONG; YI, 1999).

2.7.3. Quitosana

Um dos primeiros trabalhos citados na literatura sobre imobilização celular em quitosana pertence aos autores Vorlop e Klein (1987). Deste então, estudos que relatem técnicas de imobilização envolvendo suportes exclusivamente desse biopolímero são escassos. Provavelmente, isso decorre da dificuldade em se estabelecer protocolos padronizados que viabilizem a repetição dos ensaios. Como citado anteriormente, a quitosana não apresenta uma entidade química uniforme e as variações no grau de desacetilação e na massa molecular podem dificultar o desenvolvimento de matrizes (CRAVEIRO; CRAVEIRO; QUEIROZ, 1999). Aliado a isso, seu comprovado potencial antimicrobiano dificulta o aprisionamento de células viáveis (LIU et al., 2004).

Entretanto, estudos com células imobilizadas em matrizes heterogêneas envolvendo quitosana e outros polissacarídeos naturais já foram relatados. Nestes casos, a quitosana funciona como um agente polimerizante, fornecendo maior estabilidade ao arranjo molecular do suporte (JIALONG; YI, 1999; WEN-TAO et al., 2005).

A quitosana pode ser utilizada como suporte de imobilização na forma de filmes, membranas e esferas. A imobilização em esferas apresenta algumas vantagens comparadas a células somente adsorvidas em matrizes, como o fato de proteger os microrganismos contra os efeitos tóxicos dos poluentes que possam estar no meio, facilitar a manipulação celular e diminuir a competição com a microbiota local (KRAJEWSKA, 2004; CARVALHO, 2006).

Uma das metodologias mais simples para fabricação de esferas de quitosana consiste na coagulação. Nesta técnica, uma solução do polissacarídeo dissolvido em ácido é gotejada

em solução alcalina para formação instantânea das esferas, através de ligações inter cruzadas formadas no polímero (HE; DAVIS; ILLUM, 1999). Quando apenas a coagulação em meio alcalino não é suficiente para promover a estabilidade física desejada às esferas, estas são submetidas à reticulação ou “cross-linking” utilizando glutaraldeído. Esse processo diminui significativamente a solubilidade da quitosana em meio ácido por ligar as aminas livres ao grupamento aldeído do reticulante (Figura 5) e melhora a resistência desse polímero à degradação química e biológica (CETINUS; OZTOP, 2003; LEITE et al., 2005).

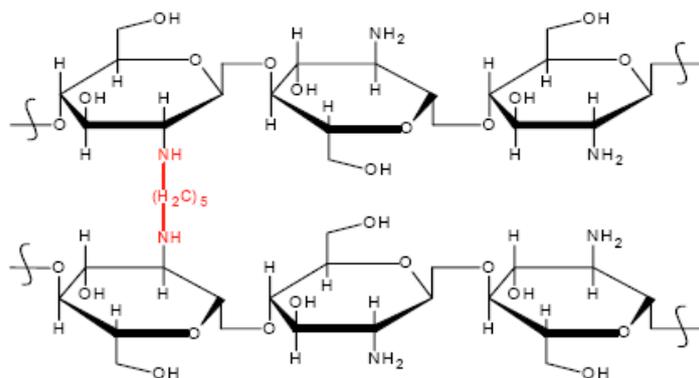


Figura 5: Estrutura da quitosana reticulada com glutaraldeído (LEITE et al., 2005).

2.8. O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é formado por um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas ou Gram-variáveis, aeróbicas, com formato de bastonete, que podem ocorrer isolados ou em cadeia, produtores de esporos resistentes a condições adversas, não apresentando mais de um esporo por célula (HOLT et al., 1994). Esses microrganismos apresentam grande plasticidade fisiológica no que se refere às condições de temperatura, pH e salinidade dos ambientes nos quais são encontrados como água, solo, associadas às plantas, ambientes poluídos, sedimentos marinhos e etc. (ENCINAS et al., 1996). Algumas espécies são patogênicas, como o *Bacillus anthracis*, mas a maioria delas é considerada própria do meio ambiente, participando inclusive de diversos ciclos biogeoquímicos (ENCINAS et al., 1996).

O ciclo vegetativo de bactérias do gênero *Bacillus* caracteriza-se sumariamente pela duplicação do material genético, seguida do alongamento citoplasmático e da divisão celular, originando duas células de dimensões equivalentes. Quando a reprodução celular torna-se

comprometida devido ao esgotamento dos nutrientes disponíveis ou drásticas variações ambientais, as respostas genéticas e metabólicas direcionam-se conjuntamente para iniciar o processo de esporulação (SERRANO et al., 2001). Sob este aspecto, a formação do endosporo bacteriano (Figura 6) pode ser entendida como o abandono da tentativa de manter o ciclo de crescimento e de divisão celular, visando à manutenção da viabilidade microbiana. Apesar de metabolicamente inerte, o endosporo é extremamente resistente a agressões de natureza física e química, reconhecidamente danosas às células vegetativas microbianas e, por armazenar em seu interior uma cópia íntegra do cromossomo bacteriano, torna-se potencialmente capaz de originar uma nova célula vegetativa quando em condições ideais, através do processo de germinação (REAL; HENRIQUES, 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

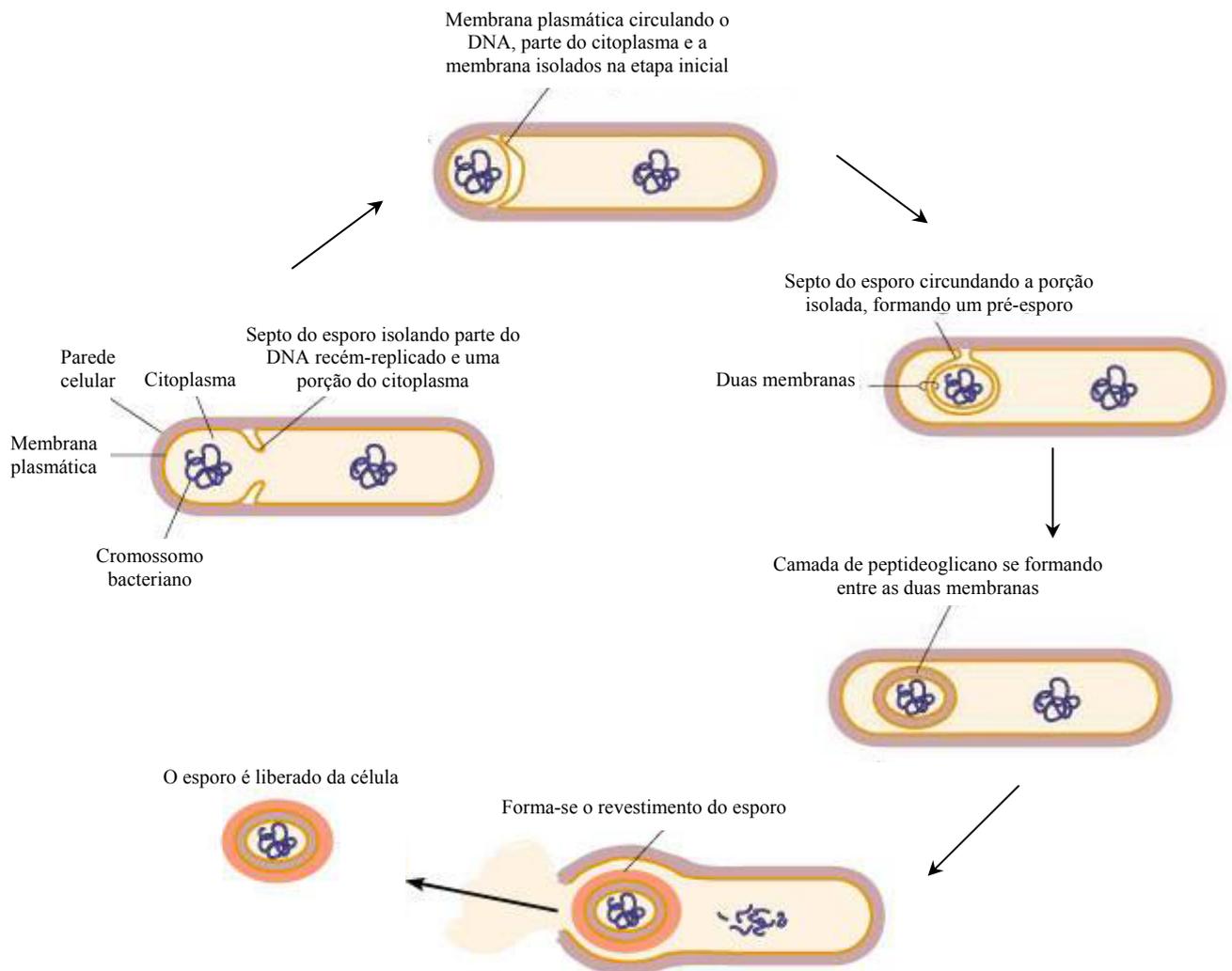


Figura 6: Processo de esporulação de *Bacillus* sp. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Por conta da grande resistência de seus esporos e da alta habilidade metabólica das células vegetativas, este gênero representa um dos grupos de microrganismos mais importantes comercialmente e conseqüentemente, um dos mais estudados. O somatório destas características tem atraído grande interesse dos mais diversos setores industriais (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004). As espécies do gênero *Bacillus* são atualmente reconhecidas como produtoras de antibióticos e outras drogas, inseticidas, biossurfactantes, compostos químicos e enzimas (IVANOVA et al., 1999). O gênero *Bacillus*, portanto, representa um grupo importante e bastante diversificado, com uma extraordinária ecologia de interesse em vários segmentos da biotecnologia (EICHLER, 2001).

2.8.1. Imobilização de esporos bacterianos em quitosana

Este trabalho se propôs a imobilizar esporos de uma linhagem de *Bacillus* tendo-se em mente que essas células são extremamente resistentes a agentes químicos e físicos incluindo danos mecânicos, temperatura, pH, radiação, detergentes, drogas, antibióticos etc. Durante a escolha dessa opção também se levou em consideração o tipo de produto final pretendido e o fato de que o estado de latência dos esporos favorece a sua estocagem por longos períodos, sem alterações de suas características originais.

Apesar dos esporos bacterianos serem bem mais resistentes a condições adversas do que as células vegetativas que lhe deram origem, trabalhos que relatem a imobilização de esporos bacterianos em quitosana ainda são raros. A quitosana possui uma atividade antimicrobiana contra muitas bactérias, alterando o funcionamento normal da membrana celular (LIU et al., 2004). Entretanto, as várias capas dos esporos podem preservar a integridade dessas células contra a ação antimicrobiana da quitosana bem como das drásticas etapas de preparação da matriz. Ao encontrar condições ideais de crescimento, os esporos germinam dando origem a novas células vegetativas que não sofrem os efeitos danosos das cargas positivas da quitosana, por estas terem sido neutralizadas durante a fabricação das microesferas (JOBIN et al., 2005).

3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo testar a quitosana obtida a partir da quitina de camarão como suporte para imobilização de uma linhagem de bactéria degradadora de n-hexadecano visando o desenvolvimento de produtos que possam ser utilizados na biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos.

3.1. Objetivos Específicos

- Selecionar uma linhagem de *Bacillus* que reúna as características de ser degradadora de hidrocarbonetos, resistente à ação antimicrobiana da quitosana e não produtora da enzima quitosanase;
- Realizar a identificação molecular dessa linhagem de bactéria;
- Descobrir as condições ideais para estimulação e produção de esporos dessa linhagem;
- Avaliar a hidrofobicidade superficial de esporos e células vegetativas;
- Verificar as condições de germinação dos esporos na presença de n-hexadecano como única fonte de carbono;
- Desenvolver um protocolo de imobilização de esporos em esferas de quitosana;
- Avaliar a eficiência dos processos de biodegradação de n-hexadecano conduzidos por células livres e por células imobilizadas;
- Verificar a produção de biossurfactantes durante a biodegradação de n-hexadecano com células imobilizadas em quitosana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

A bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* utilizada neste trabalho foi selecionada dentre 12 linhagens bacterianas previamente isoladas do tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (ETE-PICI) por Machado (2002). Estudada posteriormente por Paes (2006) e identificada parcialmente como *Bacillus* sp. LAMI007 esta bactéria foi definida como um bacilo Gram-positivo, produtor de esporos, apresentando crescimento nas seguintes condições: faixa de temperatura de 10°C a 50°C, pH entre 5,0 a 12,0 e concentração salina variando de 2% a 10% de NaCl. Quanto às características ligadas ao potencial de biodegradação, esta bactéria apresentou valores de emulsificação de querosene em torno de 54%, sendo considerada uma boa produtora de biosurfactantes. Além disso, foi caracterizada como não produtora da enzima quitosanase, característica indispensável a microrganismos que serão imobilizados nesse polímero.

A linhagem de *Bacillus* LAMI007, assim como as outras linhagens bacterianas anteriormente citadas fazem parte da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As culturas são preservadas em meio de Agar Nutritivo (Merck, Alemanha), em camada alta, recobertas com óleo mineral, sob refrigeração a 4 °C.

4.2. Quitosana

A quitosana utilizada neste trabalho (Figura 7) foi obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina extraída de cascas de camarão e foi fornecida pelo Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da UFC. A Tabela 5 apresenta as especificações e os parâmetros físico-químicos previamente determinados por Carvalho (2006).



Figura 7: Aspecto da quitosana em flocos utilizada neste trabalho.

Especificações:

- Nome comum: Quitosana.
- Natureza química: Polímero linear combinado por ligações β -(1-4)- glicosídica.
- Nome químico: Poli-2-deoxi-2-amino-glucose.
- Fórmula química: $(C_6H_{11}O_4N)_n$.
- Massa molecular: Monômero (161 Da); Polímero (60.000 – 300.000 Da).
- Método de fabricação: Produto obtido pela desacetilação da quitina.

Tabela 5: Parâmetros físico-químicos da quitosana utilizada neste trabalho e previamente determinada por Carvalho (2006).

Teste	Resultado
Perda por dessecação	7,2 %
Resíduo de Ignição	0,5 %
Grau de desacetilação	78 %
Massa molecular	117.000 Da
Viscosidade	27 cps
pH	7,8

4.3. Avaliação do efeito da quitosana sobre a linhagem selecionada

A imobilização de microrganismos em qualquer suporte polimérico requer previamente que seja realizada uma pesquisa avaliando os efeitos do polímero nas células a serem aprisionadas. No caso da quitosana, estes ensaios devem ser feitos de forma mais rigorosa visto que essa substância possui comprovadamente uma forte atividade antibacteriana (CHUNG et al., 2004, GIL et al., 2004). Desta forma, os ensaios pilotos foram realizados abordando dois aspectos. O primeiro deles foi avaliar a resistência dos esporos de *Bacillus* sp. LAMI007 à quitosana e o segundo foi verificar a capacidade desta bactéria para produzir quitosanase, o que poderia comprometer todo o processo de imobilização pretendido.

4.3.1. Resistência à ação antimicrobiana da quitosana

Para avaliar a resistência dos esporos à quitosana, 100 µL de uma suspensão de esporos recém-cultivados foram transferidos para tubos com 1 mL de gel de quitosana preparados com 4% do polímero em ácido acético 1% (p/v). Tubos com 1 mL de Caldo Nutritivo (Merck, Alemanha) foram utilizados como controle. As leituras foram realizadas após 1 h e 24 h de incubação a 37 °C, através de subcultivos em placas de Agar Nutritivo. Como a quitosana é um polímero solúvel somente a pH menor que 6,5, todos os ensaios foram realizados em pH 6,0. Esta condição foi fundamental para os experimentos visto que, neste pH, não somente os grupamentos amínicos da quitosana estão protonados, estabilizando a sua atividade antibacteriana, como também é um pH adequado para a germinação dos esporos (TSAI; HWANG, 2004).

4.3.2. Pesquisa de quitosanase

4.3.2.1. Preparo do Agar Quitosana

Inicialmente foi preparada uma solução de 1g de quitosana (GD 65-85%) dissolvida em 200 mL de ácido acético 1% que ficou sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Essa solução de quitosana foi misturada com 300 mL de uma solução tampão com a seguinte composição por litro: 1,30g de Na₂HPO₄, 3,00g de KH₂PO₄, 0,50g de NaCl, 1,00g de NH₄Cl,

0,24g de MgSO₄ e 0,01g de CaCl₂. A solução resultante foi levada ao potenciômetro para ajuste do pH a 6,0 com NaOH 1N. Separadamente, foram preparados 500 mL de uma solução a 4 % de agar. Tanto a solução de quitosana e sais minerais como a de agar foram esterilizadas em autoclave a 110 °C por 10 minutos. Após serem retiradas da autoclave, as soluções foram deixadas em banho-maria até atingirem 50 °C, quando então foram misturadas, perfazendo um litro. Esse meio, denominado Agar Quitosana, foi distribuído de forma asséptica em placas de Petri.

4.3.2.2. Detecção de quitosanase por difusão em gel

A detecção de quitosanase foi realizada conforme protocolo descrito por Park et al.(2004) com adaptações. A bactéria foi inicialmente cultivada em meio de Agar Nutritivo em placa de Petri para obtenção de colônias isoladas. Uma colônia foi transferida para Caldo Nutritivo e incubada por 24 h a 37 °C. Uma gota dessa cultura foi então dispensada sobre a superfície do meio de Agar Quitosana 0,1 %, pH 6,0. As placas de Agar Quitosana foram incubadas por 48 h a 37 °C e a atividade enzimática foi confirmada pela formação de um halo incolor ao redor da colônia. Foram feitos controles negativo (gota do meio Caldo Nutritivo) e positivo (gota de uma cultura de *Bacillus* produtora de quitosanase).

4.4. Produção dos esporos

A produção de esporos foi realizada conforme metodologia proposta por Foerster e Foster (1966) com adaptações para a linhagem estudada. O meio esporogênico utilizado apresentou a seguinte composição por litro: 1,0g de glucose; 1,0g de L-glutamato de sódio; 0,5g de extrato de levedura; 5,0g de KH₂PO₄; 1,0g de (NH₄)₂HPO₄; 0,2g de MgSO₄.7H₂O; 0,1g de NaCl; 0,05g de CaCl₂; 0,007g de MnSO₄.5H₂O; 0,01g de ZnSO₄.5H₂O; 0,01g de FeSO₄ e 20g de agar. Ao meio pronto e solidificado em placa foi adicionado 0,5 mL de uma suspensão bacteriana ajustada para 1,0 de absorvância a 600 nm. Esta cultura foi cultivada por 8 a 12 h em Caldo Nutritivo. Posteriormente, as placas foram incubadas por 72 h a 30 °C. Após este período, os esporos foram removidos assepticamente da superfície do meio e lavados 3 vezes sob centrifugação a 15 000 g por 15 min em água destilada. A suspensão final de esporos foi mantida sobre refrigeração a 4°C até ser utilizada.

4.5. Visualização dos esporos

Os esporos fixados em lâminas limpas e secas foram corados inicialmente com carbol-fucsina, corante constituído por 5g de fenol, 1g de fucsina básica, 10 mL de álcool 95% para um volume final de 100 mL de água destilada (p/v), por 3 min a quente. Após este período, os esfregaços foram lavados em água corrente e recobertos com solução aquosa de cloreto férrico 30% por 2 min. Posteriormente, foi feita lavagem das lâminas com solução de sulfito de sódio 5%, seguida de água corrente. Como contra-corante, foi adicionado aos esfregaços uma solução de verde-malaquita 1% por 1 min. Finalmente, as lâminas lavadas e secas foram visualizadas em microscópio óptico. Como controle, foram utilizadas lâminas da mesma linhagem cultivada em Agar Nutritivo (COLLINS; LYNE; GRANGE, 1989).

4.6. Identificação molecular da linhagem selecionada

Amostras de DNA da linhagem LAMI007 foram isoladas usando a metodologia de extração que utiliza o reagente CTAB (brometo de cetiltriethylamônio), de acordo com o protocolo descrito em Foster e Twell (1996). O rendimento obtido foi estimado pela medida da absorbância a 260 nm. A região codificadora do rRNA 16S foi amplificada por PCR, a partir de DNA genômico da bactéria, utilizando os iniciadores 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1525R (AAGGAGGTGATCCAGCC). Posteriormente, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% de uma alíquota da PCR para verificar a eficiência do processo e o tamanho do fragmento amplificado. Os fragmentos amplificados foram então purificados (GFX PCR DNA Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences, USA) e a concentração de DNA, determinada pela medida da absorbância a 260 nm. A seqüência completa dos produtos de PCR foi determinada usando-se o kit "DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing" (Amersham Biosciences), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Nas reações de sequenciamento foram usados os indicadores 27F e 1525R (já descritos acima) bem como outros dois, denominados 782R (ACCAGGGTATCTAATCCTGT) e 1100R (AGGGTTGCGCTCGTTG). Os produtos das reações de seqüenciamento foram analisados em um seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). A seqüência foi então comparada com aquelas

depositadas em bancos públicos de seqüências (GenBank + EMBL + DDBJ + PDB) usando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

4.7. Ensaio de germinação dos esporos

O ensaio de germinação dos esporos foi realizado inoculando-se 0,5 mL de uma suspensão de esporos de absorvância $0,600 \pm 0,020$ a 600 nm em 5,0 mL de Meio Mineral com a seguinte constituição por litro: 18,34g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 6,0g de KH_2PO_4 ; 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 4,0g de $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,0 (SAR; ROSEMBERG, 1983). Este meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C, por 15 min e, após resfriamento, adicionou-se 0,1% (v/v) de uma solução de micronutrientes composta por 10,95g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 5,0g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,54g de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,39g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,25g de $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e 0,17g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ por litro de água. Como fonte de carbono foi utilizado n-hexadecano na concentração de 1% (v/v) e, como controle, glucose na mesma concentração do hidrocarboneto. As culturas foram mantidas sob agitação de 160 rpm por sete dias à temperatura ambiente e o monitoramento da germinação foi realizado nas primeiras 24 h pela medida de turbidez e contagem de esporos viáveis a cada 2 h, sendo o processo repetido uma única vez a partir do segundo dia. Como controle, a contagem também foi realizada no tempo zero, para observar se o n-hexadecano poderia induzir a morte dos esporos ou inibir a germinação.

4.8. Ensaio de adesão bacteriana a hidrocarbonetos

A hidrofobicidade de esporos e células da linhagem de *Bacillus* LAMI007 foi determinada seguindo a metodologia proposta por Wiencek, Klapes, Foegeding (1990). Para cada concentração de n-hexadecano foi realizada uma triplicata contendo 3 mL de uma suspensão de esporos ou de células em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, com absorvância previamente ajustada entre 0,8 e 1,0 a 440 nm. A suspensão foi incubada a 35°C por 15 min, após o que se realizou a adição do hidrocarboneto nos volumes 0,1; 0,2; 0,6 e 1,0 mL. Desta forma, os tubos foram agitados por 1 min em *vortex*, após o que foram deixados em repouso por 15 min para estabilização das emulsões formadas. Posteriormente, alíquotas de 2 mL da fase aquosa de cada um dos tubos foi cuidadosamente recuperada com pipeta

Pasteur e as absorvâncias lidas em 440 nm. O percentual de hidrofobicidade (H) foi obtido segundo a fórmula $H = 100 \times [1 - (DO_{440} \text{ antes da mistura} / DO_{440} \text{ depois da mistura})]$.

4.9. Produção de biossurfactantes

Para a produção de biossurfactantes, 10% (v/v) de uma suspensão de esporos da linhagem selecionada, previamente ajustada para $1,00 \pm 0,020$, foi inoculada em Caldo Surfactina proposto por Morán et al. (2000) e enriquecida com 0,1% (v/v) da solução de micronutrientes, descrito no item 4.7 deste trabalho. O Caldo Surfactina foi preparado com 10,0g de glucose; 5,0g de extrato de levedura; 1,0g de $(NH_4)_2SO_4$; 6,0g de Na_2HPO_4 ; 3,0g de KH_2PO_4 ; 27g de NaCl e 0,6g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro de água destilada. Foram testados como fontes de carbono somente glucose e n-hexadecano suplementado com glucose, todos na concentração de 1% (v/v) no meio. As culturas, preparadas em erlenmeyers de 500 mL, foram incubadas sob agitação contínua de 160 rpm, a 30°C por 48 h e, após este período, centrifugadas a 10.000 g por 15 min. Posteriormente os sobrenadantes foram tratados para avaliar a produção do biossurfactante surfactina.

4.9.1. Pesquisa e extração de surfactina

O tratamento dos sobrenadantes para pesquisa e extração de surfactina foi feito conforme Yeh, Wei, Chang (2005). Inicialmente os sobrenadantes das culturas foram acidificados a pH 2.0 e deixados *overnight* a 4°C para precipitação de todo o biossurfactante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, recuperado com 10 mL de água. A mistura bifásica foi alcalinizada a pH 8.0, permitindo a completa dissolução do precipitado. A solução obtida foi filtrada em membrana de 0,45 μm (Millipore, USA) após o que foi misturada por cinco minutos ao mesmo volume de diclorometano. A mistura, realizada em funil de separação, ficou em repouso por 1 h e as fases foram cuidadosamente separadas. O processo foi realizado três vezes para completa recuperação da surfactina. Posteriormente, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório e a surfactina purificada, analisada em sistema HPLC, utilizando uma coluna do tipo C18. Como padrão foi utilizada surfactina comercial (Sigma-Aldrich) com 99,9% de pureza, na concentração de 0,2 mg/mL. Os parâmetros cromatográficos encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Condições operacionais do sistema HPLC (Waters, modelo 2487).

Parâmetros do sistema HPLC	Descrição / Valores
Fase móvel	20% de ácido trifluoroacético (3,8 mM) + 80% de acetonitrila
Vazão	1,0 mL / min
Volume de injeção	20 µL
Detector	UV
Absorbância	205 nm
Parâmetros da Coluna	Descrição / Valores
Nome (coluna de fase reversa)	Column Symetric C18 – Waters
Espessura	5µm

4.9.2. Medida da tensão superficial

As medidas de tensão superficial dos sobrenadantes obtidos após a produção da surfactina foram realizadas em um tensiômetro Krüss, modelo K6 utilizando o método do anel. Para cada amostra analisada foram necessários 30 mL de sobrenadante livre de células, mantido a 30 °C. O equipamento foi previamente calibrado com água destilada na mesma temperatura (McINERNEY; JAVAHERI; NAGLE JR., 1990). A importância desta medida reside em verificar a eficiência do biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. LAMI007 em reduzir a tensão superficial da água.

4.9.3. Avaliação da atividade emulsificante (E24)

A medida de emulsificação do querosene é utilizada como um parâmetro para avaliar a produção de biossurfactantes por culturas bacterianas (PRUTHI; CAMEOTRA, 1997). Sabendo que biossurfactantes produzidos por microrganismos podem ser lançados ao meio ou interagir com a parede celular, foi realizado o teste da emulsificação do querosene com a cultura, com as células e com os sobrenadantes livres de células ao longo dos experimentos de produção de surfactina. A determinação da capacidade emulsificante foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987) e modificada por Iqbal, Khalid e Malik (1995). O método consistiu em adicionar 2 mL de querosene à mesma quantidade da amostra em um tubo de ensaio com tampa rosqueada, e agitar vigorosamente (*vortex*) por

2 min. Os tubos foram deixados em repouso por 24 h, à 25 °C, e o percentual de emulsificação (E24) foi calculado dividindo-se a altura da camada emulsificada (mm) pela altura da camada total de líquido (mm), multiplicando-se por 100. Para facilitar a visualização das camadas foram acrescentados 200 µL de uma solução a 0,05% do corante Rosa Bengala, antes da agitação.

4.10. Imobilização dos esporos de *Bacillus* sp. LAMI007 em quitosana

Para os ensaios de imobilização foram utilizados alíquotas de 30 mL de uma suspensão de esporos previamente ajustada para absorvância de $1,00 \pm 0,020$ a 600 nm. A fim de padronizar o número de células em cada experimento, a contagem de esporos viáveis foi realizada 24 h antes de cada ensaio de imobilização.

Inicialmente, 30 mL da suspensão padronizada (10^7 UFC/mL) foi centrifugada a 15.000 g por 10 min a 4 °C e as células ressuspendidas em 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% de maneira asséptica. Essa suspensão foi transferida para 30 mL de uma solução de quitosana a 4 %, previamente dissolvida em 1% de ácido acético, e autoclavada a 110 °C por 10 minutos.

A suspensão de esporos em quitosana foi homogeneizada durante 10 min com o auxílio de um bastão de vidro, e em seguida, mantida em agitador magnético pelo mesmo tempo. Após este período, 5,0 mL desta solução foram utilizados para preencher uma seringa de 10 mL e gotejada em uma solução de NaOH a 8 % para a coagulação e formação das esferas. Estas permaneceram na solução alcalina durante 40 min, em agitador magnético, a fim de aumentar sua consistência. Posteriormente, foram lavados com 200 mL de solução de NaCl 0,9% esterilizada, permanecendo por 10 minutos e repetindo-se este procedimento duas vezes. Toda a preparação das esferas foi realizada sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar (Labconco, USA). Após estas lavagens, as esferas foram utilizadas nos testes de biodegradação de n-hexadecano a 1%.

4.11. Biodegradação de n-hexadecano por células livres e imobilizadas

Os ensaios de biodegradação, tanto com esporos livres quanto com esporos imobilizados, foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de Meio Mineral

(SAR; ROSEMBERG, 1983) com 1 % de n-hexadecano, 1 % de glucose, 0,1% de micronutrientes e 10 % de inóculo, preparado a partir de uma suspensão de esporos com absorvância de $1,00 \pm 0,020$ (em torno de 10^7 UFC/mL).

Os frascos permaneceram sob agitação de 160 rpm, por um período de quatro dias. A cada 24 h, duas réplicas foram utilizadas para medida do pH, contagem de viáveis e atividade emulsificante. Concomitantemente, foram preparadas culturas nas mesmas condições, exclusivamente para as análises cromatográficas, as quais foram realizadas também a cada dia durante todo o período experimental a fim de se analisar a biodegradação do n-hexadecano.

4.12. Análises cromatográficas

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) foi empregada para analisar os percentuais de degradação do n-hexadecano pelas células livres e imobilizadas em quitosana ao final dos ensaios. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia Gasosa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC. As condições operacionais deste sistema encontram-se listadas na Tabela 7.

Ao final dos ensaios de biodegradação, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min a 22 °C e os sobrenadantes foram extraídos com diclorometano (Vetec, Brasil) três vezes consecutivas na proporção 1:1 (v/v), sendo agitados vigorosamente durante 60 segundos.

Tabela 7: Condições operacionais do sistema GC-MS (Thermo Electro Corporation).

Parâmetros do sistema CG-MS	Valores
Temperatura Inicial de Injeção	100 °C
Temperatura do Detector	250 °C
Modo de Controle	Split
Pressão de Entrada	70 Kpa
Fluxo da Coluna	1mL/min
Fluxo Total	50 mL/min
Tempo de Equilíbrio	5 min
Parâmetros da Coluna	Descrição / Valores
Nome	OV-5
Espessura	0,25µm
Comprimento	30 m
Diâmetro Interno	0,25 mm

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da quitosana sobre a linhagem de *Bacillus* LAMI007

Esporos e células vegetativas de *Bacillus* sp. LAMI007 foram testados quanto à possibilidade de imobilização em quitosana baseados em dois testes preliminares: a capacidade de resistir ao potencial antimicrobiano da quitosana e não produzir quitosanase.

Somente os esporos resistiram a quitosana após 24 h de contato (Figura 8). As células vegetativas de *Bacillus* sp. LAMI007 foram inibidas logo após 1h de contato. Não foi detectada a produção de quitosanase pelo método de difusão em placa (Figura 9).

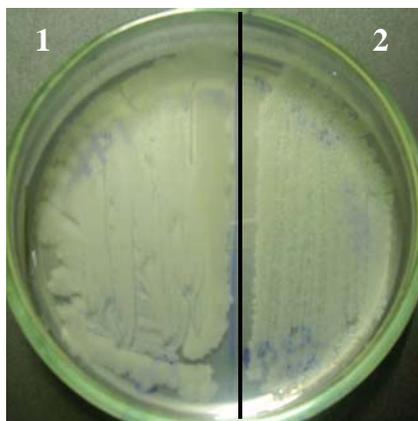


Figura 8: Cultura de *Bacillus* sp. LAMI007 proveniente da incubação de esporos em gel de quitosana 4 % por 24 h com subcultivo em Agar Nutritivo (1) e controle, crescida previamente em Caldo Nutritivo (2).

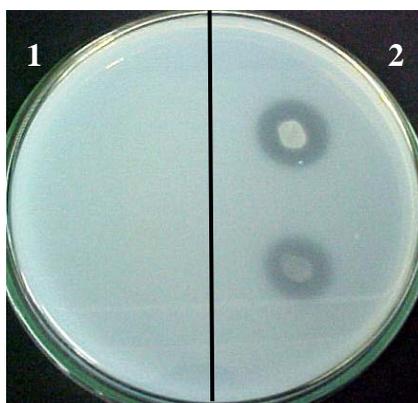


Figura 9: Detecção de quitosanase em placa de Agar Quitosana. *Bacillus* sp. LAMI007 (1), não produtor da enzima e *Bacillus* sp. LAMI 012 (2), produtor de quitosanase.

5.2. Produção e visualização dos esporos

O cultivo da linhagem LAMI007 em meio esporogênico promoveu a esporulação de 100% da cultura. A técnica de coloração proposta por Collins, Lyne e Grange (1989) permitiu a distinção entre os esporos e as células vegetativas. Como controle, foram utilizadas culturas em Agar Nutritivo incubadas nas mesmas condições de tempo e temperatura que àquelas inoculadas em meio esporogênico. De acordo com a Figura 10 podemos observar a esporulação de todas as células do meio experimental.

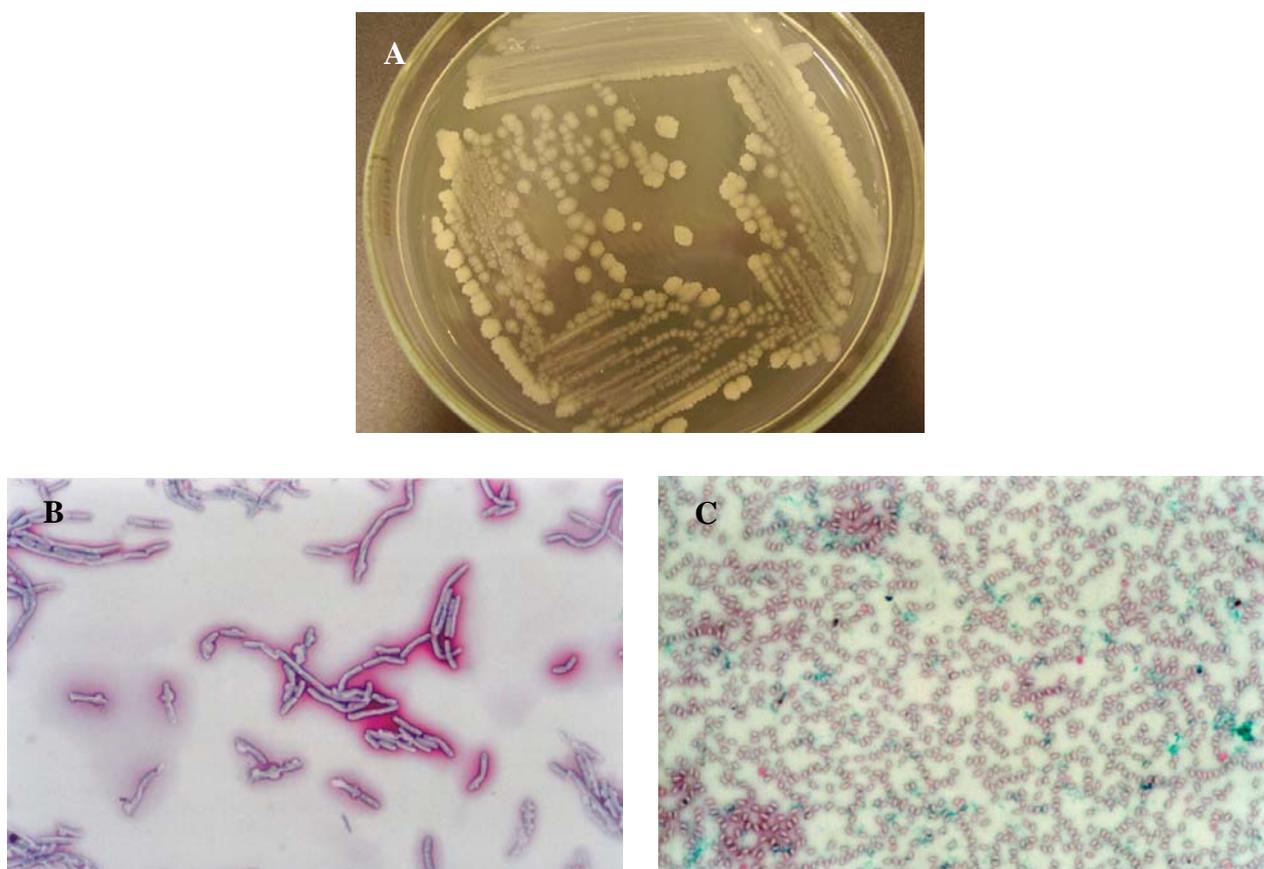


Figura 10: Características culturais e morfológicas da linhagem de *Bacillus* LAMI007. Aspecto colonial (A) em Agar Nutritivo após 24 h de cultivo à temperatura ambiente. Células vegetativas (B) cultivadas em Agar Nutritivo e esporos (C) cultivados em meio indutor de esporulação, por 72 h à temperatura ambiente. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico com aumento de 1000 x.

5.3. Identificação molecular da linhagem LAMI007

A seqüência da bactéria selecionada para imobilização em quitosana, linhagem LAMI007, apresentou maior similaridade (99%) com o rDNA 16S de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* linhagem 168, cuja seqüência completa do genoma está depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) com número de acesso BSUB0001. O alinhamento entre as seqüências 16S desta linhagem e do *B. subtilis* subsp. *subtilis* linhagem 168 é mostrado na Figura 11.

```

(1) 1 CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGG 60
    |||
(2) CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGG

(1) 61 AGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAA 120
    |||
(2) AGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAA

(1) 121 GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTT 180
    |||
(2) GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTT

(1) 181 CAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT 240
    |||
(2) CAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT

(1) 241 TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC 300
    |||
(2) TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC

(1) 301 ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC 360
    |||
(2) ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC

(1) 361 AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA 420
    |||
(2) AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA

(1) 421 GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTA 480
    |||
(2) GCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTA

(1) 481 ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT 540
    |||
(2) ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT

(1) 541 TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC 600
    |||
(2) TGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC

(1) 601 CCCC GGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGA AACTGGGGA AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG 660
    |||
(2) CCCC GGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGA AACTGGGGA AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG

(1) 661 TGG AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG 720
    |||
(2) TGG AATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG

```

```

(1) 721 CGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG 780
      |||
(2)     CGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG

(1) 781 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCCGCCCT 840
      |||
(2)     ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCCGCCCT

(1) 841 TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC 900
      |||
(2)     TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC

```

Figura 11: Alinhamento entre as seqüências do rDNA 16S da linhagem LAMI007 (1) e de *B. subtilis* subsp. *subtilis* linhagem 168 (2). Essa última seqüência foi obtida do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Nucleotídeos conservados nas duas seqüências estão indicados por barras verticais.

5.4. Germinação dos esporos na presença de n-hexadecano

Os esporos da linhagem LAMI007 não germinaram na presença de n-hexadecano como única fonte de carbono. Ao ser suplementado com glucose, o meio que continha n-hexadecano viabilizou a germinação após 20 h de incubação a 30 °C sob agitação de 160 rpm. O tempo de germinação foi acompanhado pela contagem dos esporos viáveis, sendo utilizado sempre um controle somente com glucose.

As células originadas pela germinação dos esporos apresentaram hidrofobicidade elevada, o que pôde ser contemplado nos ensaios de E24 (Figura 12). Essa característica ficou mais evidente com o passar do tempo, fato comprovado com a migração celular em direção ao n-hexadecano após 72 h de incubação em meio mineral. A produção de espuma nas culturas foi interpretada como um indício da liberação de emulsificantes para o meio (Figura 13).

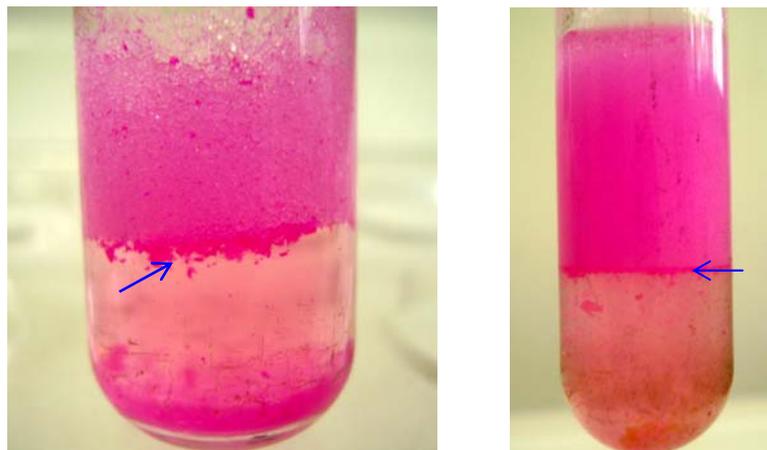


Figura 12: Aspecto da emulsificação de querosene pela cultura integral de *B. subtilis* LAMI007 após 48 h (esquerda) e 72 h (direita) de incubação em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano e 1% glucose. As setas apontam para os agregados celulares.

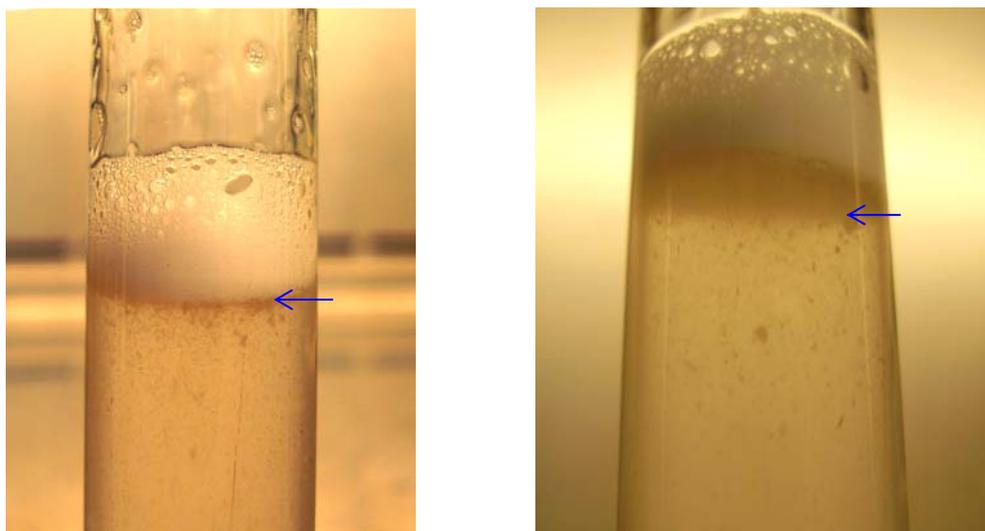


Figura 13: Aspecto da cultura de *B. subtilis* LAMI007 após 72 h de incubação à temperatura ambiente em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano e 1% glucose. A produção de espuma e a distribuição das células próximas à espuma são indicativos da liberação de biossurfactantes e do caráter hidrofóbico das células, respectivamente.

Visualizando ao microscópio óptico a porção da emulsão produzida pela cultura de *B. subtilis* de 72 h foi possível perceber que as células realmente se distribuíram na interface

entre a emulsão e a água, sendo também encontradas dentro da emulsão O/W (óleo em água), conforme mostra a Figura 14.

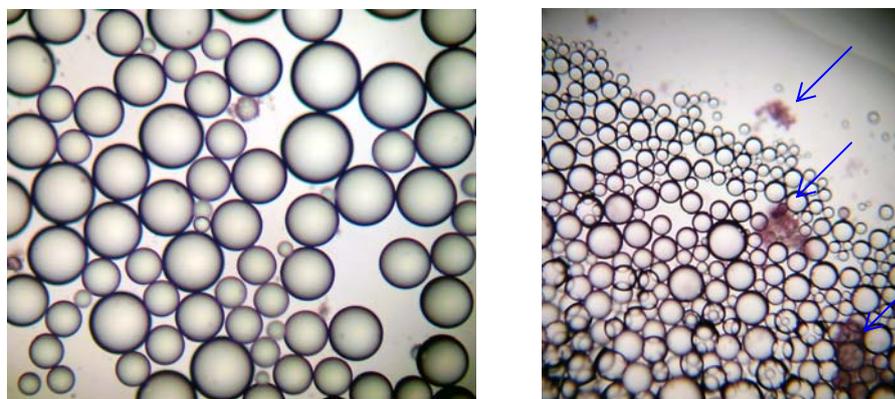


Figura 14: Aspecto da emulsão O/W (óleo em água) produzida por uma cultura de 72 h de *B. subtilis* LAMI007 visualizada ao microscópio óptico com aumento de 100x. As setas apontam para os aglomerados celulares distribuídos entre a emulsão e a fase aquosa.

5.5. Hidrofobicidade de esporos e células de *B. subtilis* LAMI007

O ensaio de adesão a hidrocarbonetos revelou que os esporos da linhagem estudada são mais hidrofóbicos que suas células vegetativas. Como observado na Figura 15, o percentual de hidrofobicidade foi elevando com o aumento da concentração de n-hexadecano. Essa mudança foi mais significativa para os esporos.

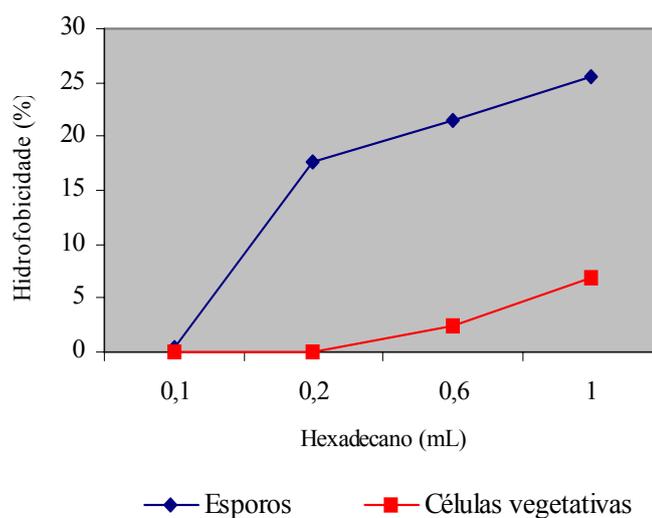


Figura 15: Hidrofobicidade de esporos e células vegetativas de *B. subtilis* LAMI007 na presença de 1% de n-hexadecano.

5.6. Produção e extração de surfactina

As Figuras 16 e 17 mostram respectivamente o aspecto da cultura após 48 h de incubação e a surfactina precipitada após o tratamento do sobrenadante com ácido clorídrico. Na Figura 18 podemos observar os índices de emulsificação obtidos com a cultura, células e sobrenadante livre de células ao final do experimento de produção de biossurfactantes. O cromatograma da Figura 19 mostra que houve produção de surfactina nas culturas preparadas apenas com glucose como fonte de carbono e naquelas contendo glucose mais n-hexadecano como fontes de carbono. O pico próximo ao da surfactina refere-se, provavelmente, a um dos seus seis isômeros descritos na literatura (DUFOUR et al., 2005).

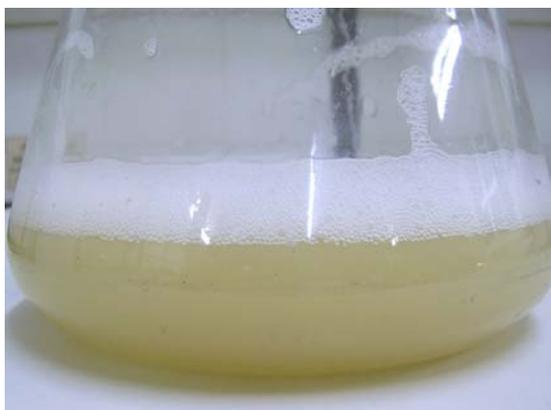


Figura 16: Aspecto da cultura de *B. subtilis* LAMI007 em Caldo Surfactina após 48 h de cultivo à temperatura ambiente sob agitação.



Figura 17: Precipitação da surfactina após tratamento do sobrenadante de uma cultura de 48 h de *B. subtilis* LAMI007 com ácido clorídrico 1N.

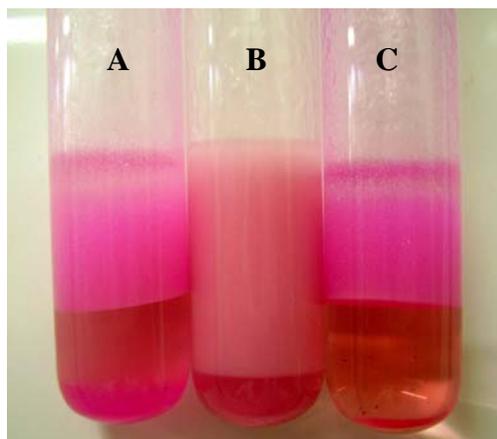


Figura 18: Aspecto da emulsificação de querosene promovido pela cultura integral de *B.subtilis* LAMI007 em Caldo Surfactina (A), pelas células livre de meio (B) e pelo sobrenadante livre de células (C).

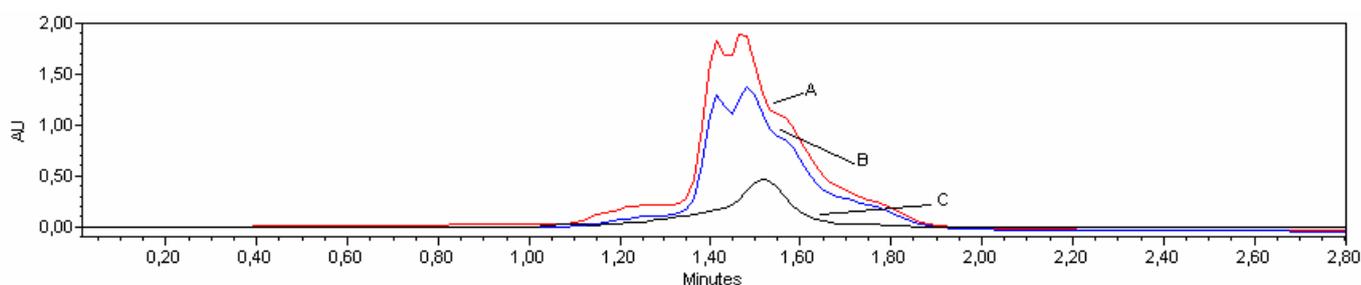


Figura 19: Cromatograma dos sobrenadantes das culturas de *B. subtilis* LAMI007 em Caldo Surfactina contendo 1% glucose (A) e contendo 1% glucose mais 1% de n-hexadecano (B). O pico identificado por (C) se refere à surfactina comercial na concentração de 0,2 mg/mL.

5.7. Imobilização dos esporos em quitosana

As esferas produzidas neste trabalho mostraram-se consistentes e uniformes antes dos ensaios de biodegradação (Figura 20), entretanto, se desintegraram após 48 h no ensaio de biodegradação (Figura 21).

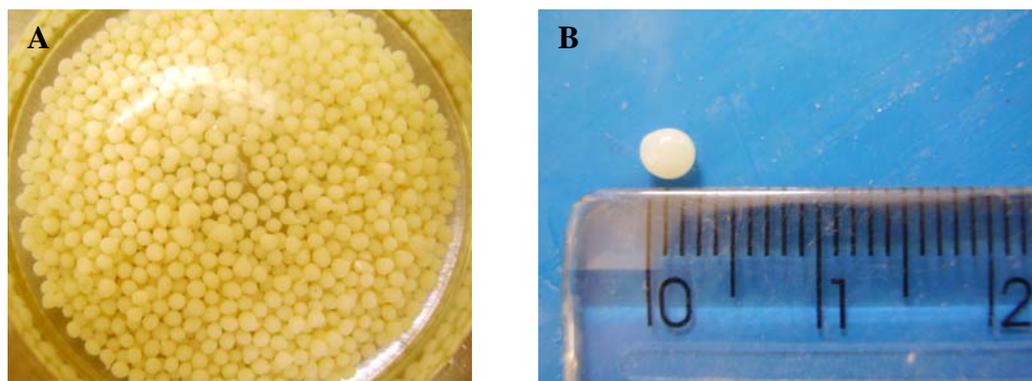


Figura 20: Aspecto das esferas de quitosana com esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados antes do ensaio de biodegradação (A) e diâmetro das esferas (B).

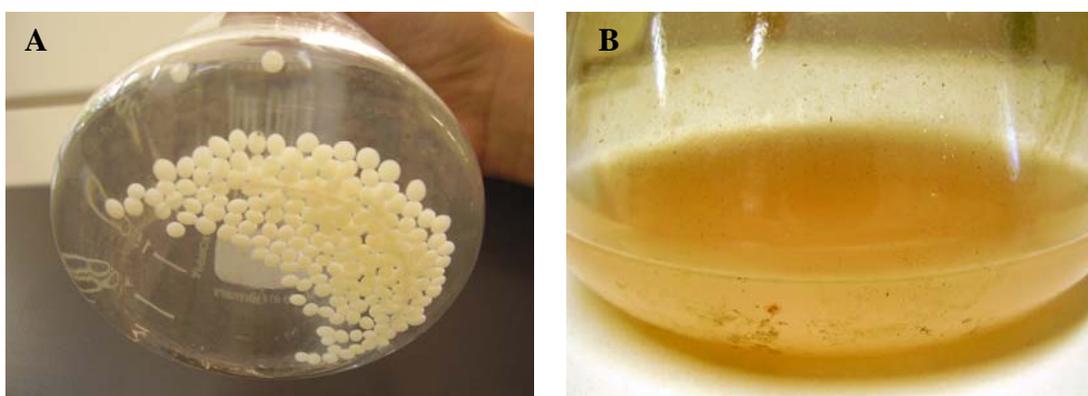


Figura 21: Aspecto da cultura de esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados em quitosana em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano no tempo zero (A) e após 48 h de incubação (B).

Observado este fato ao longo das repetições dos ensaios, e verificando que o pH das culturas praticamente não variou, fez-se necessário uma nova pesquisa de atividade quitosanásica na cultura. A variação do pH é uma condição limítrofe para a manutenção da integridade das esferas de quitosana, visto que este polímero é facilmente solúvel em pH ácido (CHATELET; DAMOUR; DOMART, 2001; RABEA et al., 2003). Para verificar a possível causa da desintegração das esferas, alíquotas da cultura com 24 h e 48 h de crescimento foram inoculadas em Agar Quitosana. Após o tempo de incubação, foram observados halos de hidrólise da quitosana na cultura que havia crescido por 48 h, confirmando a produção da enzima nessas condições experimentais (Figura 22).

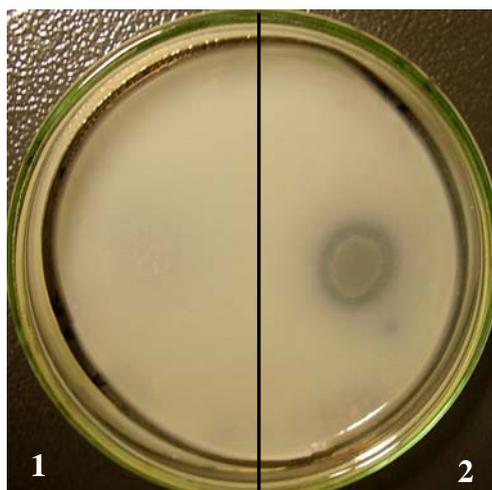


Figura 22: Pesquisa de quitosanase em cultura de 24 h (1) e 48 h (2) de *B. subtilis* LAMI007 imobilizada em quitosana e crescida em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano mais 1% de glucose.

A fim de solucionar o problema da desintegração das esferas, optou-se por reticular a quitosana com glutaraldeído após a imobilização dos esporos. Dessa forma, as esferas prontas e neutralizadas foram imersas sem agitação em uma solução de glutaraldeído 0,3% por 12 h à temperatura ambiente. Ensaio prévios foram realizados para se determinar a concentração ideal do agente reticulante, visto se tratar de uma substância tóxica, utilizada inclusive como agente químico no controle microbiano.

Estes ensaios consistiram em manter uma suspensão de esporos em solução de glutaraldeído por 12 h, tempo mínimo necessário para reticulação e aumento da estabilidade das esferas de quitosana. O glutaraldeído inicialmente foi testado a 0,5%. Esta concentração inviabilizou o processo, pois destruiu todos os esporos após 12 h de contato. Novos testes foram realizados com concentrações menores até o estabelecimento de 0,3% como valor ideal tanto para reticulação da quitosana como para a sobrevivência dos esporos.

As esferas submetidas à reticulação em glutaraldeído não apresentaram nenhuma diferença visual quando comparadas ao grupo controle (Figura 23). Entretanto mostraram-se mais firmes, o que pôde ser comprovado esmagando-se as esferas com auxílio de espátulas. Durante os ensaios de biodegradação, entretanto, foi observada a mudança de cor nas esferas reticuladas (Figura 24), de creme para laranja, devido à reação prolongada dos grupos aldeídos com as amins presentes na quitosana (LEITE et al., 2005).

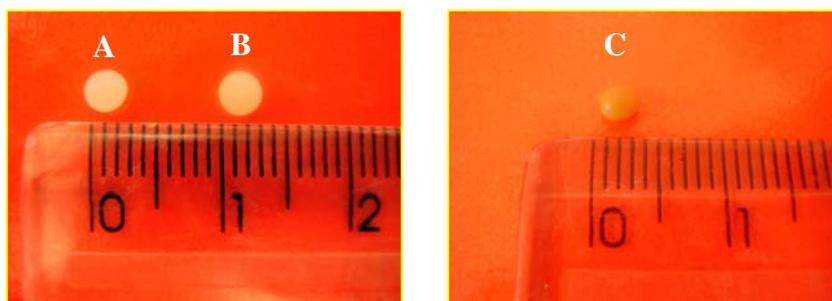


Figura 23: Esferas de quitosana contendo esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados. Controle (A) e reticulada com glutaraldeído 0,3% por 12 h (B). Em (C) esfera reticulada após 24 h de incubação do ensaio de biodegradação de n-hexadecano, evidenciando a mudança de cor.

Após a imobilização dos esporos em quitosana por coagulação alcalina, neutralização e reticulação em glutaraldeído 0,3%, as esferas foram exaustivamente lavadas em água destilada sob agitação para a retirada do excesso do agente reticulante. Posteriormente, foram submetidas a ensaios de biodegradação do n-hexadecano. Como controle foram utilizados esporos em esferas não reticuladas (Figura 24). Ao longo de 96 h foram realizadas contagem dos esporos nas esferas reticuladas e no sobrenadante das culturas, além de medidas de pH e da atividade emulsificante do sobrenadante.

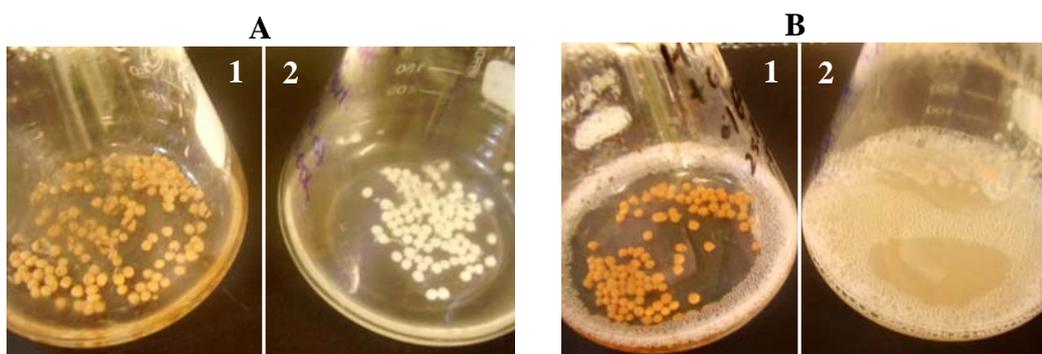


Figura 24: Aspecto das culturas de esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados em meio mineral contendo 1% de n-hexadecano mais 1% glucose com 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. Esferas reticuladas com glutaraldeído (1) e esferas não reticuladas (2) (controle).

5.8. Biodegradação de n-hexadecano por células livres e imobilizadas

Os ensaios de biodegradação do n-hexadecano foram executados com células livres e imobilizadas. As Tabelas 8 e 9 apresentam os parâmetros avaliados durante os quatro dias nos quais foram realizados os experimentos de biodegradação.

Tabela 8: Parâmetros avaliados durante a biodegradação de 1% de n-hexadecano em meio mineral suplementado com 1% glucose por células de *B. subtilis* LAMI007 livres.

Tempo	Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	pH	Biodegradação do n-hexadecano (%)	Índice de emulsificação E24 (%)		
				cultura integral	células	sob
0	$2,1 \times 10^7 \pm 2,7$	$7,00 \pm 0,02$	0	0	0	0
24	$2,5 \times 10^7 \pm 1,2$	$6,96 \pm 0,02$	0	0	0	0
48	$6,4 \times 10^8 \pm 2,7$	$6,86 \pm 0,04$	98,74	38,5	55,0	34,0
72	$5,2 \times 10^8 \pm 1,8$	$6,73 \pm 0,03$	99,30	55,0	53,5	54,2
96	$3,1 \times 10^8 \pm 2,3$	$6,92 \pm 0,03$	99,97	8,0	15,5	22,3

Tabela 9: Parâmetros avaliados durante a biodegradação de 1% de n-hexadecano em meio mineral suplementado com 1% glucose por células de *B. subtilis* LAMI007 imobilizadas na forma de esporos em esferas de quitosana reticuladas com 0,3% de glutaraldeído.

Tempo	Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g) nas esferas	Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) no sobrenadante	pH	Biodegradação do n-hexadecano (%)	Índice de emulsificação E24 (%)
					sobrenadante
0	$3,2 \times 10^6 \pm 1,0$	0	$7,00 \pm 0,02$	0	0
24	$2,7 \times 10^6 \pm 0,9$	0	$6,95 \pm 0,01$	0	0
48	$3,8 \times 10^6 \pm 1,3$	$2,2 \times 10 \pm 0,5$	$6,96 \pm 0,02$	99,51	6,3
72	$1,1 \times 10^7 \pm 1,8$	$1,3 \times 10^2 \pm 0,4$	$6,90 \pm 0,03$	ND*	53,1
96	$4,3 \times 10^7 \pm 1,2$	$3,2 \times 10^2 \pm 0,3$	$6,87 \pm 0,02$	ND*	54,8

*ND – pico não detectado

Esporos de *B. subtilis* LAMI007, após germinarem, foram capazes de produzir biosurfactantes quando cultivados de forma livre ou imobilizados em esferas de quitosana em meio mineral contendo n-hexadecano e glucose, conforme pode ser observado na Figura 25.

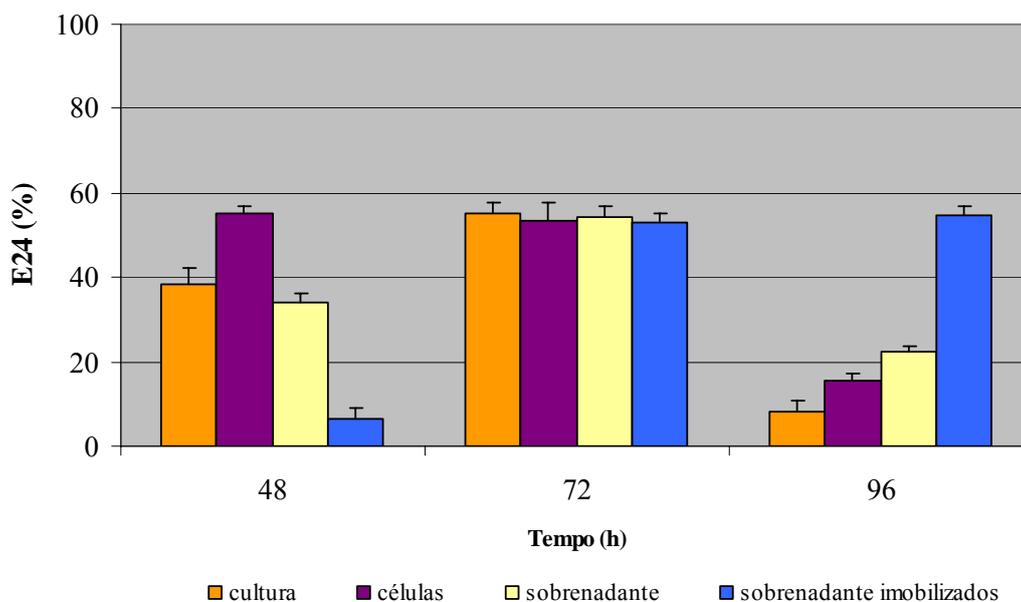


Figura 25: Capacidade emulsificante da cultura de *B. subtilis* LAMI007, células e sobrenadante ao longo da biodegradação de 1% de n-hexadecano por células livres e do sobrenadante, por células imobilizadas.

A análise da biodegradação de n-hexadecano por CG-MS mostrou que o hidrocarboneto foi consumido em maior quantidade após 48 h para os ensaios realizados tanto com células livres (Figura 26) como com imobilizadas (Figura 27).

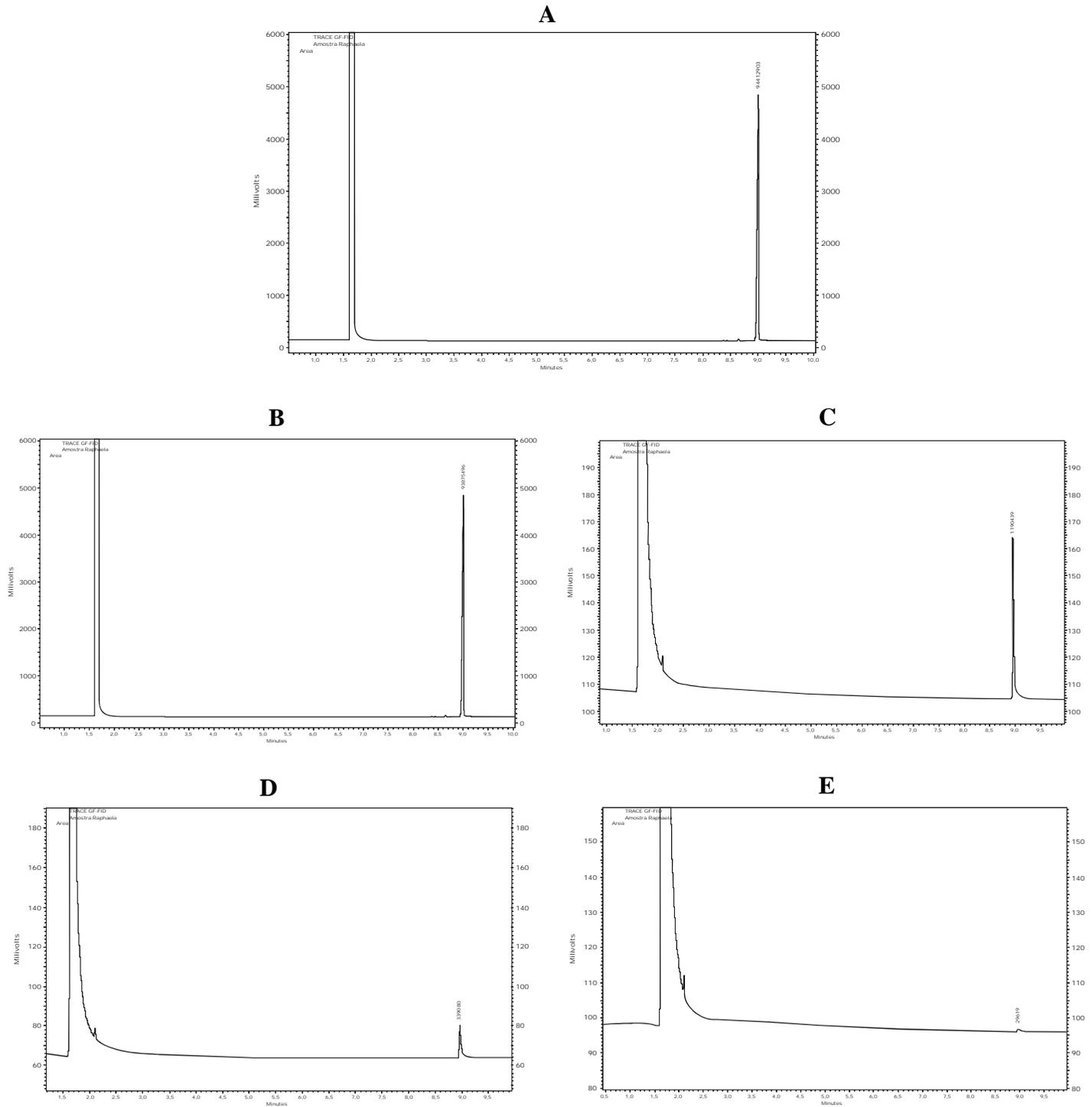


Figura 26: Perfis cromatográficos de 1% de n-hexadecano extraído do sobrenadante da cultura de *B. subtilis* LAMI007 no tempo zero (A), com 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D) e 96 h (E) do início do ensaio de biodegradação com células livres.

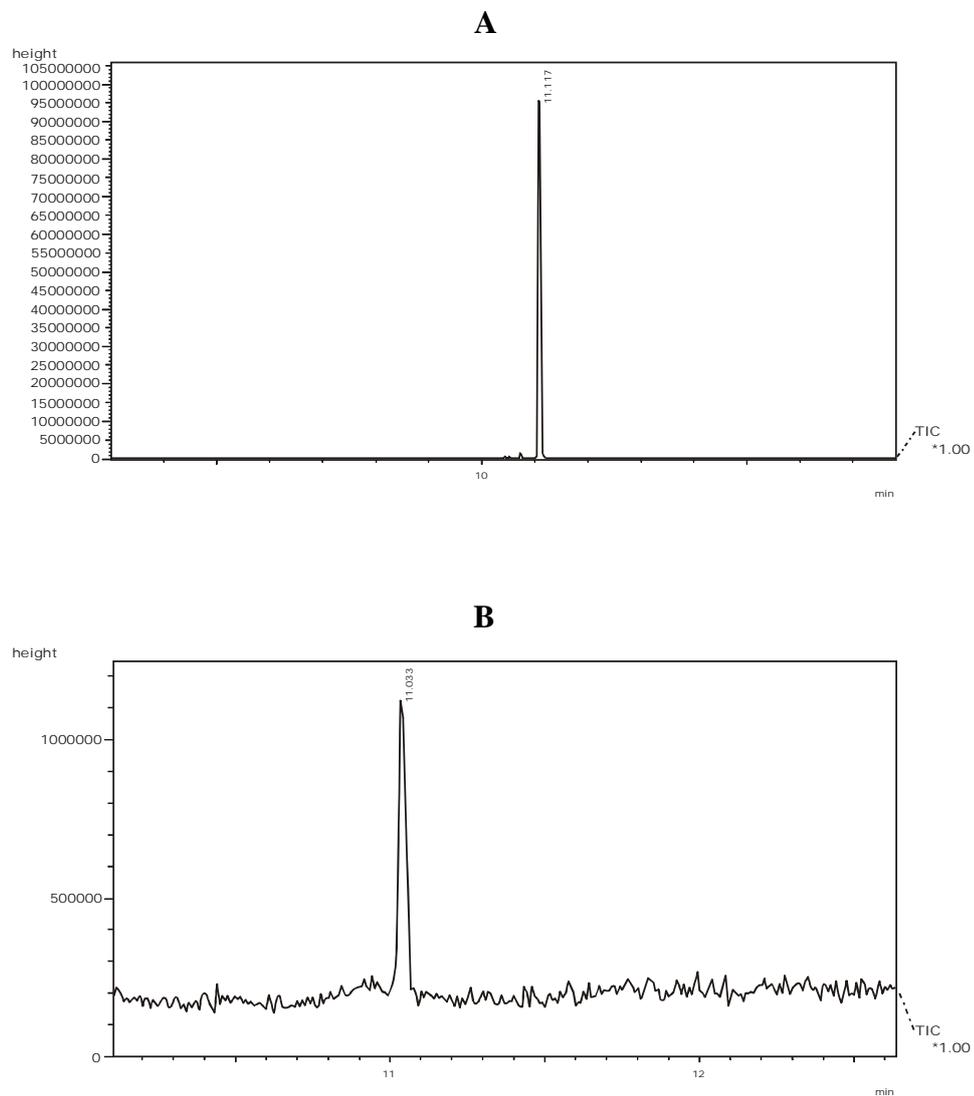


Figura 27: Perfil cromatográfico de 1% de n-hexadecano extraído do sobrenadante da cultura de *B. subtilis* LAMI007 no tempo zero (A) e com 48 h (B), ou início do ensaio de biodegradação com células imobilizadas.

6. DISCUSSÃO

O uso da quitosana como matéria prima exclusiva para o desenvolvimento de suportes utilizados em imobilização de células microbianas ainda é uma tecnologia incipiente. Isto certamente advém do fato da quitosana, quando em solução ácida, ter elevada atividade antimicrobiana provocada pela interação entre as amins livres do polímero e as superfícies celulares microbianas (NO et al. 2002, RABEA et al., 2003; CHUNG et al., 2004; LIU et al., 2004; KURITA, 2006). Após uma cuidadosa revisão bibliográfica foram encontrados apenas dois trabalhos recentes que descrevem o uso exclusivo da quitosana como suporte para imobilização de células. Jobin et al. (2005) utilizaram *Streptomyces melanospororfaciens* imobilizado em esferas de quitosana para controle de fitopatógenos no solo, enquanto que Gentili et al. (2006) trabalharam com *Rhodococcus corynebacterioides* adsorvidos na superfície de lascas de quitosana para uso na biorremediação de derivados de petróleo em microcosmos. Entretanto, a grande maioria dos trabalhos relata o uso de suportes heterogêneos preparados a partir de misturas de alginatos, carragenanas, quitosana, poliuretano, poliacrilamida, celulose, sílica e etc. (CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996).

Tendo esse desafio em mente e pretendendo agregar valor aos resíduos da carcinicultura, nosso grupo vem tentando descobrir linhagens bacterianas nativas que possam ser imobilizadas em quitosana e desenvolver produtos que encontrem aplicação na biorremediação de ambientes naturais ou industriais contaminados com hidrocarbonetos. Esse esforço já gerou resultados bem sucedidos, como aqueles relatados por Carvalho (2006) e Costa (2006). Carvalho (2006) explorou o potencial de utilização de paredes celulares de uma linhagem de *Staphylococcus saprophyticus* LAMI001 imobilizadas em quitosana como biosurfactante e Costa (2006) descobriu uma linhagem ambiental de *B. pumilus* com grande potencial para degradar n-hexadecano na forma imobilizada em quitosana. Esses trabalhos deram origem a dois pedidos de patentes encaminhadas dia 31 de janeiro de 2007 ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial do Ceará (INPI-Ce).

O presente trabalho apresenta de forma inédita a imobilização de esporos de uma linhagem de *Bacillus* em esferas de quitosana. Essa idéia reúne em si várias vantagens. A primeira delas diz respeito ao fato de explorar uma forma celular latente, extremamente resistente aos agentes químicos, físicos e aos efeitos tóxicos da quitosana. Segundo, os esporos resistem melhor que as células vegetativas ao drástico tratamento de preparação da

matriz. Terceiro, devido ao grau de desidratação dos esporos, eles podem ser armazenados por longos períodos sem alterar suas características originais, facilitando o desenvolvimento de produtos desidratados.

Para um microrganismo ser imobilizado em quitosana é necessário que ele resista à ação tóxica desse polissacarídeo e não produza enzimas quitinolíticas capazes de impedir a formação da matriz ou levar a sua desintegração, inviabilizando a sua utilização.

A capacidade de a quitosana interagir com superfícies microbianas e alterar a permeabilidade das células estão diretamente relacionados ao seu grau de desacetilação e sua massa molecular (NO et al. 2002; RABEA et al., 2003). Por outro lado, a quantidade de cargas negativas presentes na superfície celular bacteriana também pode ser citado como um fator condicionante dessa interação. Chung et al. (2004) estudaram a interação de quitosana com grau de desacetilação (GD) variando entre 75% e 95%, por 6 h, em relação à cinco espécies bacterianas, sendo duas Gram-positivas e três Gram-negativas. O efeito da quitosana foi analisado de acordo com o caráter hidrofílico das células e a densidade de cargas aniônicas presente nas superfícies das bactérias testadas. Os resultados mostraram que, pelo fato da superfície celular das Gram-negativas ser mais aniônica e mais hidrofílica, estas células foram mais sensíveis ao efeito danoso da quitosana que as Gram-positivas.

O fato dos esporos de *B. subtilis* LAMI007 terem resistido à quitosana (GD 78%) por 24 h concordaram com o estudo anteriormente descrito para as bactérias Gram-positivas, haja vista que a superfície dos esporos é formada por densas camadas de proteínas que o tornam não somente resistente e impermeável como também mais hidrofóbico que suas células vegetativas, restringindo os efeitos danosos da quitosana. Além disso, é importante lembrar que como o esporo é fisiologicamente inerte não há permeabilidade entre o citoplasma celular e o meio, o que minimiza ainda mais os efeitos causados por qualquer substância que tenha como objetivo alterar a permeabilidade da membrana.

O ensaio de produção de quitosanase pelas células vegetativas de *B. subtilis* LAMI007 confirmou o que foi descrito por Paes (2004). Quando cultivadas em agar contendo 0,1% de quitosana por 24 h, essa bactéria não produziu a enzima, o que favoreceu a sua escolha para os testes de imobilização realizados neste trabalho. Portanto, esta linhagem preencheu os requisitos exigidos para um microrganismo ser imobilizado em quitosana (CHUNG et al., 2004; LIM; HUDSON, 2003; LIU et al., 2004).

A linhagem de *Bacillus* LAMI007 foi parcialmente identificada por Paes (2006) com base em análises das características morfológicas, culturais e fisiológicas. Entretanto, apesar dessa caracterização, não foi possível chegar à identificação definitiva da espécie. Por este motivo, a identificação molecular foi de fundamental importância. Ela permitiu não somente definir a espécie bacteriana, como, a partir desta informação, avaliar se este microrganismo apresentava seqüências de genes semelhantes ou próximas às de linhagens patogênicas.

A seqüência da linhagem de *Bacillus* LAMI007 apresentou maior similaridade (99%) com o rDNA 16S de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* linhagem 168, cuja seqüência completa do genoma está depositada no GenBank com número de acesso BSUB0001, assim como com seqüências de outras linhagens de *B. subtilis*, incluindo: IDCC1105 (AY995572), IDCC1103 (AY995570), IDCC1102 (AY995569) e IDCC1101 (AY995568). Trata-se, portanto, de uma espécie de nível de biossegurança 1 ou não patogênica.

Todos os testes realizados neste trabalho para avaliar o desempenho de *B. subtilis* LAMI007 imobilizado em quitosana foram comparados com o desempenho de células livres nas mesmas condições.

O primeiro resultado que emergiu dos ensaios pilotos foi que os esporos não germinaram em meio mineral tendo 1% de n-hexadecano como única fonte de carbono. Para superar esse problema, o meio foi suplementado com 1% glucose, sendo a germinação prontamente observada após 20 h de incubação à temperatura ambiente. Este resultado confirmou aquilo descrito por Setlow, Cowan, Setlow (2003), que os açúcares atuam como moléculas sinalizadoras do processo de germinação. A interação da glucose com sítios receptores de nutrientes localizados na membrana do esporo desencadeia a quebra do estado de dormência do esporo que envolve quatro etapas principais. A primeira delas diz respeito à desintegração da capa externa do esporo, rica em dipicolinato de cálcio e proteínas hidrofóbicas que garantem a sua resistência. Em seguida, ocorre a degradação das proteínas ácido solúveis do esporo (PPAS), responsáveis por proteger o material genético bacteriano contra agressões ambientais letais a maioria dos microrganismos. Posteriormente, o diâmetro celular aumenta pela entrada de água, seguida da síntese de novas moléculas de RNA e proteínas. A célula, neste momento, encontra-se metabolicamente ativa e preparada para se reproduzir (PAIDHUNGAT; RAGKOUSI; SETLOW, 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

As células vegetativas de *B. subtilis* LAMI007 apresentaram elevada hidrofobicidade após a germinação (Figuras 12, 13 e 14), o que não foi observado no ensaio de hidrofobicidade celular utilizando uma suspensão de células em tampão fosfato (Figura 15). Entretanto, como os ensaios de germinação foram realizados na presença de glucose, é possível especular que esta substância pode ter sido ainda posteriormente utilizada como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes, moléculas tensoativas de caráter anfifílico que podem interagir com a membrana celular, alterando a sua hidrofobicidade inicial. Segundo Haferburg et al. (1986) bactérias do gênero *Bacillus* produzem biossurfactantes preferencialmente na presença de substratos hidrossolúveis, como a glucose.

O fenômeno da mudança de hidrofobicidade celular foi criteriosamente descrito por Ahimou, Jacques, Deleu (2000) que estudaram a interação dos biossurfactantes com membranas celulares de sete linhagens de *B. subtilis*. Segundo esses autores, a síntese de lipopeptídeos (natureza química dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus*) independe da hidrofobicidade inicial das células. Ao serem liberadas no meio, essas moléculas podem orientar-se ao redor da membrana, alterar o seu caráter hidrofóbico e permitir a utilização de substratos de diferentes polaridades. Outra consequência observada é a melhoria da fixação celular em superfícies variadas, através de interações hidrofóbicas (MUKHERJEE; DAS, 2005). No caso de células naturalmente hidrofílicas, como as células vegetativas da linhagem de *B. subtilis* LAMI007, a mudança de hidrofobicidade pode ser explicada pela adsorção da região polar dos lipopeptídeos na superfície da membrana deixando livre a porção apolar da molécula. O contrário pode ser observado em células hidrofóbicas (AHIMOU; JACQUES; DELEU, 2000). Em ambos os casos, portanto, a hidrofobicidade superficial é alterada.

Reportando-se ainda ao experimento de germinação dos esporos, é interessante observar que pelo fato da glucose ter sido preferencialmente consumida nas primeiras horas de crescimento da cultura restou somente o n-hexadecano para ser utilizado como fonte de carbono. Como as células de *B. subtilis* LAMI007 naturalmente têm fraco caráter hidrofóbico, é possível sugerir que a produção de biossurfactantes foi fundamental para viabilizar a captura e utilização do hidrocarboneto (MUKHERJEE; DAS, 2005). Além disso, a Figura 18 mostra que realmente as células tornam-se bastante hidrofóbicas quando da produção de biossurfactantes em um meio utilizado especificamente para esta finalidade. Como observado nessa figura, a emulsificação do querosene foi muito mais acentuada quando o ensaio foi realizado somente com as células e não houve variação significativa entre os percentuais de

emulsificação obtidos com a cultura e com o sobrenadante livre de células, o que fortalece as hipóteses levantadas.

Os resultados obtidos com o ensaio da adesão bacteriana a hidrocarbonetos realizado com os esporos e as células vegetativas da linhagem de *B. subtilis* LAMI007 vieram confirmar os relatados por Wiencek, Klapes, Foegeding (1990), no qual a maioria das espécies de *Bacillus* estudadas apresentam hidrofobicidade superficial maior nos esporos do que nas células vegetativas. Essa diferença é atribuída à relativa abundância de proteínas e camadas externas encontradas na capa do esporo, comparado à concentração de peptideoglicano encontrado na superfície de células vegetativas de bactérias Gram positivas. A relação entre a composição da capa do esporo e a hidrofobicidade dessas células já foi descrita por outros autores, os quais, por tratamento químico, destruíram as camadas protéicas externas ao esporo minimizando grandemente o seu caráter hidrofóbico (KUTIMA; FOEGEDING, 1987).

A avaliação da produção de biossurfactantes pelas células de *B. subtilis* LAMI007 foi realizada pelo cultivo das células em Caldo Surfactina (MORÁN et al., 2000). A surfactina é um dos biossurfactantes mais potentes já estudados e é produzida por linhagens de *B. subtilis*. Foi descrita primeiramente por Arima, Kakinuma e Tamura (1968). Esse surfactante é formado basicamente por um heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácido graxo contendo de 13 a 15 carbonos (CARRILLO et al., 2003). Em contraste com a maioria dos metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*, a biossíntese de surfactina ocorre tanto na fase exponencial como na estacionária (VATER, 1986).

Para acompanhar a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LAMI007 foram realizadas medidas de emulsificação da cultura, das células e do sobrenadante livre de células após 48 h de cultivo, além da medida de tensão superficial do sobrenadante. Estas medidas somente foram realizadas após 48 h porque com 24 h nenhuma mudança significativa foi observada, já que ao longo deste período, os esporos estão em processo de germinação.

Quando cultivadas na presença somente de glicose como fonte de carbono, a produção de surfactina foi superior à obtida pelo cultivo contendo n-hexadecano e glicose (Figura 19). Segundo Cooper et al.(1981) e Sandrin, Peypoux e Michel (1990), a presença de n-hexadecano no meio induz ao aumento da biomassa celular, mas inibe a produção de surfactina. Os resultados obtidos no presente trabalho vão de encontro aos relatados pelos autores supracitados. Entretanto, a formação de biossurfactante por linhagens de *B. subtilis*

em meio contendo somente glucose como fonte de carbono já foi bastante descrita em outros estudos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; MULLIGAN, 2004; MUKHERJEE; DAS, 2005).

Como citado por Costa (2006) atividades emulsificantes acima de 40 % já são suficientes para encorajar a pesquisa de biossurfactantes. A atividade emulsificante do biossurfactante produzido pela linhagem LAMI007 praticamente foi a mesma para a cultura e sobrenadante, em torno de 40 %. Entretanto, conforme observamos na Figura 18, as células, isoladas, foram capazes de promover uma emulsificação do querosene bastante estável, com E24 atingindo 80 %. Em relação à diminuição da tensão superficial, o sobrenadante livre de células conseguiu reduzir a tensão da água de 72,0 mN/m para 44,0 mN/m ($\pm 2,0$). A literatura cita que a surfactina consegue diminuir a tensão superficial da água até 27,0 mN/m (COOPER; ZAJIC, 1980). Apesar dos valores obtidos serem elevados, estes resultados podem ser considerados satisfatórios, visto que as medidas foram realizadas com os sobrenadantes ainda não tratados. Além disso, eles foram proporcionais aos valores encontrados para o índice de emulsificação do sobrenadante. Youssef et al. (2004) e Costa (2006) relataram que a habilidade de uma molécula formar emulsões nem sempre está associada à diminuição da tensão superficial. Todos esses resultados fortalecem a hipótese de que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI007, mesmo que liberado no meio, apresenta uma forte tendência de interagir com a membrana celular dessa bactéria.

As esferas de quitosana produzidas neste trabalho contendo os esporos imobilizados apresentaram diâmetro médio de 3 μ m, semelhante aos obtidos por Valentini et al. (2000) e especialmente por Costa (2006) quando imobilizou células de *B. pumilus* também em quitosana. Por outro lado, diferindo do trabalho de Costa (2006), as esferas de quitosana com os esporos de *B. subtilis* LAMI007 não foram estáveis sob agitação após 48 h, conforme pode ser observado na Figura 24. Como praticamente não houve queda do pH ao longo dos experimentos (Tabela 9), o que poderia provocar a dissolução da quitosana, a hipótese mais provável para explicar a desintegração das esferas é que ela tenha ocorrido devido à produção de quitosanase pela linhagem LAMI007. É possível sugerir que o prolongamento do ensaio com as células imobilizadas por 48 h tenha permitido a expressão do gene responsável pela produção de quitosanases (Figura 22). Essa hipótese é reforçada pelo fato da pesquisa dessas enzimas em gel de quitosana ter sido realizada inicialmente somente após 24 h de incubação das células na presença do biopolímero. Portanto, é possível afirmar que nessa linhagem a síntese de quitosanase ocorre de forma induzida pela substrato e não de forma constitutiva.

A digestibilidade da quitosana ou de qualquer outro suporte imobilizante somente é desejada quando este funciona especificamente como um carreador das células ao sítio de ação. Desta forma, após a chegada ao ambiente, as células podem degradar o suporte e conseqüentemente serem liberadas (JOBIN et al., 2005).

Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos que tratam sobre o aumento da estabilidade de biomateriais à base de quitosana. Torres et al. (2005) relataram a produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente e compararam o uso do glutaraldeído, epícloridrina e da diminuição do grau de desacetilação como estratégias para fortalecer o polímero. Esses autores concluíram que o glutaraldeído foi o agente reticulante mais eficiente.

Os agentes reticulantes podem aumentar a estabilidade das esferas de quitosana por duas vias. No caso do glutaraldeído, a reticulação ocorre pela ligação formada entre os grupos amina da quitosana com os grupos aldeído do reticulante (Figura 5). A epícloridrina age de forma diferenciada, bloqueando as hidroxilas (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; GINANI et al., 1999).

O glutaraldeído é extensamente utilizado em imobilização e reticulação de proteínas através de seus grupos amina residuais, sendo um método simples, economicamente viável e conveniente para ligantes sensíveis a pH alcalino, como no caso da quitosana. O fortalecimento da matriz polimérica é normalmente obtida utilizando-se um excesso do reticulante que proverá a quitosana com grupos diferentes das aminas iniciais da quitosana. A ligação covalente entre o grupo amina e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a extremos de pH e temperatura (KIMURA et al., 1999; BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; LEITE et al., 2005).

O problema da desintegração da quitosana foi solucionado pela reticulação das esferas com 0,3 % de glutaraldeído após a imobilização dos esporos. É possível que a ligação do glutaraldeído aos grupamentos NH₂ da quitosana possa ter inibido o efeito tóxico do polímero e, conseqüentemente, a produção de quitosanase pelas células imobilizadas. Pelo fato do glutaraldeído ser reconhecidamente tóxico (TENNEN et al., 2000; SERRY; KADRY; ABDELRAHMAN, 2003), foram realizados ensaios prévios para verificar a resistência dos esporos de *B. subtilis* LAMI007 ao efeito letal dessa substância. Dentre as concentrações testadas (0,5%; 0,4%; 0,3% e 0,2%), a concentração de 0,3 % por um tempo 12 h de contato foram as condições ideais capazes de provocar a reticulação sem comprometer a viabilidade

da maioria dos esporos. A redução do número inicial de células ficou apenas em torno de 10 % após o contato com o glutaraldeído. Entretanto o valor perdido durante a reticulação foi prontamente recuperado ao longo dos experimentos de biodegradação. As esferas, após 96 h, permaneceram íntegras, sendo insignificante o número de células detectado no sobrenadante da cultura se comparado às que permaneceram imobilizadas (Tabela 9).

As condições aqui utilizadas podem ser consideradas, no mínimo, mais econômicas do que aquelas testadas por Leite et al. (2005), que utilizaram solução de glutaraldeído a 2,5% para reticular por 24 h esferas de quitosana a 5%. Além disso, foram menos tóxicas às células.

As esferas de quitosana contendo os esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados foram utilizadas como inóculo nos ensaios de biodegradação de n-hexadecano ($C_{16}H_{34}$). Este composto foi escolhido primeiramente pelo fato de ser um dos hidrocarbonetos mais estudados em experimentos de biodegradação e segundo, por representar a maior fração alifática do diesel. O n-hexadecano pode ser encontrado em rios, como resultado de atividades rotineiras com derivados de petróleo em refinarias, liberado dos tanques de estocagem ou até mesmo por derramamento acidental (CHÉNIER et al., 2003). Desta forma, estudos visando à seleção de microrganismos com capacidade de degradar alcanos de cadeia longa são de fundamental importância para otimizar os processos de biorremediação (COSTA, 2006).

Para os ensaios de biodegradação tanto com esporos livres como imobilizados utilizou-se um inóculo inicial de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Nos testes com esporos livres, o número de unidades formadoras de colônias aumentou até 48 h para 10^8 UFC/mL permanecendo neste valor ao longo de todo o experimento (Tabela 8). Não foi observada a fase de declínio ou morte celular, apesar dos cromatogramas revelarem que mais de 98 % do hidrocarboneto já tivesse sido degradado. Isso pode ser explicado pelo fato da bactéria produzir esporos sob condições adversas, o que garante a viabilidade celular mesmo na ausência de nutrientes.

Em relação aos índices de emulsificação obtidos nos ensaios com células livres (Tabela 8) é possível verificar que após 48 h as células isoladas apresentaram maior capacidade de emulsificar o querosene, comparado à cultura integral e ao sobrenadante. Esse resultado concordou com o obtido nos ensaios de produção de surfactina discutido anteriormente. Além disso, neste mesmo período foi detectado o maior consumo de n-hexadecano. Segundo Naitali-Bouchez et al. (1999) as bactérias que utilizam n-hexadecano, o fazem em geral por duas vias. A primeira delas envolve o contato direto entre as células e

gotas não emulsionadas do hidrocarboneto. A segunda diz respeito a uma prévia emulsificação ou solubilização via produção de biossurfactantes. Segundo esses autores, a captura mediada por biossurfactantes é mais comum entre microrganismos que degradam n-hexadecano. Puntus et al. (2005) reforçaram esse dado ao estudar 45 linhagens bacterianas degradadoras de n-hexadecano e verificarem que 75 % delas foram capazes de produzir biossurfactantes. Essas observações nos permitem sugerir que a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LAMI007 pode ser uma forma de adaptação da cultura para degradar o n-hexadecano e seus subprodutos.

Analisando os cromatogramas obtidos a partir dos ensaios com os esporos de *B. subtilis* LAMI007 imobilizados, observamos que 99,51% do n-hexadecano foi biodegradado com 48 h de incubação (Tabela 9). Este resultado torna-se surpreendente ao se analisar três aspectos. O primeiro deles envolve o fato de que, mesmo imobilizados e em menor número, os esporos germinaram após 24 h, e as células de *B. subtilis* LAMI007 conseguiram degradar o hidrocarboneto tão bem quanto às células livres que se encontravam numa população dez vezes maior. O segundo reporta para o fato de o número de células final mostrar que houve a recuperação do número de células perdidos durante o processo de imobilização dos esporos e reticulação das esferas de quitosana. E por último, mas não menos importante, perceber que, mesmo estando imobilizadas e tendo biodegradado o hidrocarboneto, as células de *B. subtilis* LAMI007 foram hábeis em produzir e liberar moléculas com atividade biossurfactante no meio. Além disso, vale ressaltar que, ao contrário do observado com as células livres, os biossurfactantes produzidos pela cultura imobilizada não foram utilizados posteriormente como uma fonte de carbono, sendo facilmente detectados pelo ensaio de emulsificação com o sobrenadante das culturas de 72 h e 96 h. A liberação de biossurfactantes para o meio e a permanência destes no sobrenadante após um período mais longo que o observado no experimento com células de *B. subtilis* LAMI007 livres, pode ser devido aos atrasos difusionais promovidos pela imobilização. O fato das células encontrarem-se aprisionadas em um espaço limitado pode ter dificultado a captura do substrato necessário à produção de surfactina, o que levou à maior lentidão na liberação do biossurfactante e, posteriormente, na sua captura para ser reutilizado como uma fonte secundária de carbono. Apesar disso, a permanência de biossurfactante no sobrenadante da cultura por um período maior pode ser analisado de forma positiva, no que se refere ao uso destas células

imobilizadas em escala industrial para produção e recuperação de biossurfactantes, já que facilmente a porção emulsificante pode ser removida da cultura.

Os resultados obtidos neste trabalho fortaleceram em nosso grupo a idéia de se desenvolver um produto à base de esporos imobilizados em quitosana que apresenta vantagens relacionadas tanto ao suporte utilizado, como ao microrganismo imobilizado. No caso do suporte, podemos perceber que utilizar a quitosana como matriz de imobilização de células pode ser uma forma de reciclar a quitina residual proveniente da carcinicultura e conseqüentemente, uma fonte de renda. Relacionado ao microrganismo, podemos descrever inúmeras vantagens: os esporos imobilizados encontram-se protegidos tanto da competição com outros microrganismos como da ação tóxica do poluente; os esporos conseguem germinar e as células multiplicam-se dentro das esferas; são bastante hábeis em biodegradar tanto quanto as células livres, mesmo com menor biomassa celular; conseguem realizar a biodegradação e produzir biossurfactantes; liberam para o meio substâncias com atividade emulsificante que podem ser prontamente recuperadas no sobrenadante da cultura; as esferas contendo os microrganismos podem ser facilmente manipuladas; os esporos bacterianos podem ser armazenados por longos períodos (os utilizados neste trabalho ainda encontram-se viáveis após 1 ano e meio de armazenamento) sem o risco de ocorrerem mutações no material genético celular; as esferas podem ser biodegradadas por serem fabricadas por uma substância natural.

Vislumbrados com os resultados obtidos, coroamos este trabalho dando entrada no pedido da patente “Microesferas de quitosana com esporos de *Bacillus subtilis* LAMI007 não patogênicos imobilizados para uso na biodegradação de hidrocarbonetos, biofertilização, biotratamento de efluentes industriais, e domésticos e produção de biossurfactantes” (ver anexo) recentemente encaminhada ao INPI-Ce, na certeza de que fortalecemos o papel da ciência em descobrir, a partir do estudo da própria natureza, formas de recuperar o planeta no qual vivemos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho permitem-nos concluir que a linhagem identificada molecularmente como *Bacillus subtilis* LAMI007 pode ser imobilizada em esferas de quitosana reticulada com glutaraldeído e aplicada com segurança em atividades de biorremediação que envolvam a degradação de hidrocarbonetos alifáticos.

As células de *B. subtilis* LAMI007 imobilizadas em quitosana podem também ser adaptadas para produção em larga escala de surfactina que encontra uma série de aplicações industriais importantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v.31, p.488-494, 1968.

BNDES - BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. **III Simpósio Internacional sobre a Indústria do Camarão Cultivado**. 2006. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/revista/rev2617.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2007.

BECERRA, M. BAROLI, B.; FADDA, A.M.; BLANCO MÉNDEZ, J.; GONZÁLEZ, M.I.S. Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. **Microbial Technology**, v.29, p.506-512, 2001.

BEPPU, M.M.; ARRUDA, E.J.; SANTANA, C. C. Synthesis and characterization of dense and porous structures of chitosan. **Polímeros**, v.9 (4), p.163-169, 1999.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells, In:_____. **Methods in Biotechnology**. SHUMAUSER, H. P. Totowa: Humana press, 1997. v. 1, cap.1, p.1-11.

BORENSTEIN, I.M. **Uso de alumina como suporte para imobilização de leveduras**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 87p., 2003.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. **Aquicultura**: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2003, 128p.

BRASIL. Departamento de Pesca e Aqüicultura. **Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado**: seguimento de mercado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: MAPA/SARC/DPA, CNPq, ABCC, 2001, 276 p.

CAHK, G.; SAVACI, H.; CAHK, P.; OZDAMAR, T.H. Growth and κ -carrageenan immobilization of *Pseudomonas dacunhae* cells for L-alanine production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.67-74, 1999.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biocatalizadores imobilizados. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.36, p.48-57, 2006.

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

CARVALHO, T.V. **Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traço e petróleo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 98p., 2006.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: Metabolic behavior of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochemical Engineering Journal**, v.25 (1), p.25-31, 2005.

CASSIDY, M.B.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p.79-101, 1996.

CETINUS, A.S.; OZTOP, H.N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.889-894, 2003.

CHAMPGNE, C.P.; BLAHUTA, N.; GAGNON, C.A. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.681-688, 2000.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

CHENG, C.Y.; LI, Y.K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.32, p.197-203, 2000.

CHÉNIER, M.R.; BEAUMIER, D.; ROY, R.; DRISCOLL, B.T.; LAWRENCE, J.R.; GREER, C.W. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69 (9), p.5170-5177, 2003.

CHUNG, Y.C.; SU, Y.P.; CHEN, C.C.; JIA, G.; WANG, H.L.; WU, J.C.G.; LIN, J.G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.25, p.932-936, 2004.

COLLINS, C.H.; LYNE, P.M.; GRANGE, J.M. **Microbiological Methods**. 6^a ed, Butterworth & Co (Publishers) Ltda., 1989, 408p.

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

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 additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.408-412, 1981.

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

COSTA, S.P. **Biodegradabilidade de n-hexadecano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 100p., 2006.

CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C.; QUEIROZ, D.C. **Quitosana: a fibra do futuro**. PADETEC, Fortaleza, 1999, 124p.

CREDIDIO, E. **Carragenana: um antigo alimento do futuro**. 2006. Disponível em: <http://www.laticinio.net/inf_tecnicas.asp?cod=39>. Acesso em: 10 jan. 2007.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science**, v.30, p.38-70, 2005.

DESAI, P.D.; DAVE, A.M.; DEVI, S. Entrapment of lipase into k-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.31, p.143-150, 2004.

DIAS, J.C.T.; REZENDE, R.P.; LINARDI, V.R. Biodegradation of acetonitrile by cells of *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 immobilized in alginate, k-carrageenan and citric pectin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.61-66, 2000.

DUFOUR, S.; DELEU, M.; NOTT, K.; WATHELET, B.; THONART, P.; PAQUOT, M. Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1726, p.87-95, 2005.

DUTTA, K. P.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DUTTA, J. Chitin and chitosan for versatile applications. **Journal Macromolecular Science**, v. 42 (3), p.307-354, 2003.

EICHLER, J. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. **Biotechnology Advances**, v.19, p.261-278, 2001.

ENCINAS, J. P.; SANZ-GOMES, J.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GARCIA-ARMESTO, M. R.; OTERO, A. Evaluation of different systems for identification of *Bacillus* strains isolated from spanish fermented sausages. **Meat Science**, v.42, p.127-131, 1996.

FETT, W.F.; WIJEY, C. Yields of alginates produced by fluorescent pseudomonads in batch culture. **Journal of Industrial Microbiology**, v.14, p.412-415, 1995.

FOERSTER, H.F.; FOSTER, J.W. Response of *Bacillus* spores to combinations of germinative compounds. **Journal of Bacteriology**, v.91 (3), p.1168-1177, 1966.

FONTANA, J.D.; MENDES, S.V.; PERSIKE, D.S.; PERACETTA, L.F.; PASSOS, M. **Carotenóides: cores atraentes e ação biológica**. 2000. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: 12 jan. 2007.

FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION. **Fishery country profile: the Federative Republic of Brazil**. 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/fcp/FICP_BRA_E.asp>.

FOSTER, G.D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation**. Principles and Practice. John Wiley & Sons, England, 1996, 328p.

FREEMAN, A.; LILLY, M.D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p.335-345, 1998.

FROTA, I. L. N. **Análise dos determinantes da vantagem competitiva da carcinicultura nordestina**. Dissertação (Mestrado em Administração) – Programa de Pós-Graduação em Administração – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 112p., 2005.

GAMZAZADE, A. I.; NASIBOV, S. M.; ROGOZHIN, S. V. Study of lipoprotein sorption by some sulfoderivatives of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.34, p.381-384, 1997.

GENTILI, A.R.; CUBITTO, M.A.; FERRERO, M; RODRIGUÉZ, M.S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.57, p.222-228, 2006.

GIL, G.; DEL MÓNACO, S.; CERRUTTI, P.; GALVAGNO, M. Selective antimicrobial activity of chitosan on beer spoilage bacterial and brewing yeasts. **Biotechnology Letters**, v.26, p.569-574, 2004.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v.36, p.809-812, 2001.

GILSON, D.D.; THOMAS, A.; HAWKES, F.R. Gelling mechanism of alginate beads with and without immobilized yeast. **Process Biochemistry**, v.25, p.104-108, 1990.

GINANI, M.F.; NAVARRO, M.V.; NASCIMENTO, E.G.; OLIVEIRA, U.O.B. Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. **Química Nova**, v.22 (6), p.801-804, 1999.

GOOSEN, M.F.A. **Applications of Chitin and Chitosan**. Technomic Publishing Company, Pennsylvania, U.S.A., 1997, 336 p.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a Review. **Separation and Purification**, v.38, p.43-74, 2004.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; SPINELLI, S. Environmental of chitosan-supported catalysts: Catalytic hollows fibers for the degradation of phenolic derivatives. **Separation Science and Technology**. v.40, p.633-657, 2005.

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H.P. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advances in Biochemistry and Engineering Biotechnology**, v.33, p.54-93, 1986.

HAMDY, M.K.; KIM, K.; RUDTKE, C.A. Continuous ethanol production by yeast immobilized onto channeled alumina beads. **Biomass**, v.21, p.189-206, 1990.

HE, P.; DAVIS, S.S.; ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v.187 (1), p.53-65, 1999.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, 787p.

HUANG, C.; CHEN, S.; PAN, J. R. Optimal condition for modification of chitosan: a biopolymer for coagulation of colloidal particles. **Water Research**, v.34, n.3, p.1057-1062, 2000.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactants by gamma ray-induced mutant *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.

IVANOVA, E. P.; VYSOTSKII, M. V.; SVETASHEV, V. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; GORSHKOVA, N. M.; MIKHAILOV, V. V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUCHI, T.; YOSHIKAWA, S. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. **International Microbiology**, v.2, p.267-271, 1999.

JAMAI, L.; SENDIDE, K.; ETTAYEBI, K.; ERRACHIDI, F.; HAMDOUNI-ALAMI, O.; TAHRI-JOUTI, M.A.; MCDERMOTT, T.; ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Letters**, v.204, p.375-379, 2001.

JIANLONG, W.; LIPING, H.; HANCHANG, S.; YI, Q. Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia* sp. **Chemosphere**, v.44, p.1041-1046, 2001.

JIANLONG, W.; YI, Q. Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan gels. **Chemosphere**, v.38 (13), p.3109-3117, 1999.

JOBIN, G; COUTURE, G.; GOYER, C.; BRZEZINSKI, R.; BEAULIEU, C. Streptomycete spores entrapped in chitosan beads as a novel biocontrol tool against common scab of potato. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.104-110, 2005.

KAFETZOPOULOS, D.; MARTINO, A.; BOURIOTIS, V. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. **Applied Biological Sciences**, v.90, p.2564-2568, 1993.

KOURKOUTAS, Y.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A.A.; TZIA C. Effect of storage of immobilized cells at ambient temperature on volatile by-products during wine-making. **Journal of Food Engineering**, v.74, p.217-223, 2006.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial Technology**, v.35, p.126-139, 2004.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v.26, p.1921-1971, 2001.

_____. Chitin and Chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v.8, p.203-226, 2006.

KUTIMA, P. M.; P. M. FOEGEDING. Involvement of the spore coat in germination of *Bacillus cereus* spores. **Applied Environmental Microbiology**, v.53, p.47-52, 1987.

LEITE, F.; MODESTO, C.M.D.; NASCIMENTO, R.F.; DIAS, F.S. Adsorção de Cd(II) de soluções aquosas em microesferas de n-carboximetil-quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.6, n.3, p.213-236, 2005.

LENG, Y.; ZHENG, P.; SUN, Z.H. Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli* SW0209-52. **Process Biochemistry**, v.41 (7) p.1669-1672, 2006.

LIM, S.H.; HUDSON, S.M. Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. **Journal of Macromolecular Science Part C – Polymer Reviews**, v.43 (2), p.223-269, 2003.

LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v.95, p.147-155, 2004.

LORENZ, R.T., CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Tibtech**, v.18, p.160-167, 2000.

MACHADO, B.M. **Bactérias extremófilas em efluente final da estação de tratamento de esgoto do campus do Pici (ETE-Pici)**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 51 p., 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. Prentice Hall, São Paulo, 2004, 608p.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.428-434, 2002.

MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; SIMON, M.; BI, D.; KISSEL, T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceuticals**, v.281, p.45-54, 2004.

McINERNEY, M.J.; JAVAHERI, M.; NAGLE JR., D.N. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Journal of Industrial Microbiology**, v.5, p.95-102, 1990.

MORÁN, A.C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L.; SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v.11 (1), p.65-71, 2000.

MOUEDDEB, H; SANCHEZ, J.; BARDOT, C.; FICK, M. Membrane bioreactor for lactic acid production. **Journal of Membrane Science**, v.114, p.59-71, 1996.

MUKHERJEE, A.K.; DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiology Ecology**, v.54, p.479-489, 2005.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133 (2), p.183-198, 2004.

NAITALI-BOUCHEZ, M.; RAKATOZAFY, H.; MARCHAL, R.; LEVEAU, J.Y.; VANDECASTEELE, J.P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.421-428, 1999.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4^a ed, W.H. Freeman and Company, New York, 2004, 975p.

NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. **Journal of Biotechnology**, v.80, p.189-193, 2000.

NO, H.K.; LEE, K.S.; MEYERS, S.P. Correlation between physicochemical characteristics and binding capacities of chitosan products. **Journal of Food Science**, v.65 (7), p.1134-1137, 2000.

NO, H.K.; PARK, N.Y.; LEE, S.H.; MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.65-72, 2002.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; INANLOU, D.N.; FARAHMAND, B.; SALEH, M.; SHEIKH-UL-ESLAM, F; VAEZ, J. Biotransformation of alcohols to aldehydes by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC5080. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.150-153, 2003.

PAES, F.A. **Perfil fisiológico e enzimático de cepas de *Bacillus* e screening para a produção de biosurfactantes**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 55 p., 2006.

PAIDHUNGAT, M.; RAGKOUSI, K.; SETLOW, P. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca²⁺-dipicolinate. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.4886-4893, 2001.

PARK; JAM, P.; JE, J.Y.; BYUN, H.G.; MOON, S.H.; KIM, S.K. Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.14 (2), p.317-323, 2004.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. **Biotechnology Techniques**, v.11(9), p.671-674, 1997.

PUNDLE, A.; PRABHUME, A.; SIVARAMAN, H. Immobilization of *Saccharomyces uvarum* cells in porous beads of polyacrylamide gel for ethanolic fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.426-429, 1988.

PUNTUS, I.F; SAKHAROSVKY, V.G.; FILONOV, A.E.; BORONIN, A. M. Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene. **Process Biochemistry**, v.40, p.2643-248, 2005.

RABEA, E.I.; BADAWEY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules - American Chemical Society**, v.4 (6), p.1457-1465, 2003.

REAL, G.; HENRIQUES, A.O. Controlo da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, v.68, p.2-12, 2001.

REVISTA ABCC . Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Ano 8, n. 1, Mar. 2006.

_____. Ano 6, n. 1, Mar. 2004.

_____. Ano 5, n. 4, Dez. 2003.

ROBERTS, G.A.F. **Chitin Chemistry**. Macmillan Press, London, 1992, 350 p.

ROCHA, I.P. As estatísticas da carcinicultura brasileira em 2001. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC**, Recife, n.1, p.10-16, 2002.

_____. Carcinicultura Brasileira em 2002. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC**, Recife, n.1, p.30-45, 2003.

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

SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13 (4), p.242-249, 2003.

SAR, N.; ROSENBERG, E. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. **Current Microbiology**, v.9, p.309-314, 1983.

SATO, T.; ISHII, T.; OKAHATA, Y. *In vitro* gene delivery mediated by chitosan: effect of pH, serum and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. **Biomaterials**, v.22, p.2075–2089, 2001.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SCHMUHL, R.; KRIEG, H. M. Adsorption of Cu (II) and Cr (II) by Chitosan: Kinetics and equilibrium studies. **Water Research Commission**, v. 27, p. 1-7, 2001.

SCHULZ, P.C.; RODRIGUEZ, M.S.; DEL BLANCO, L.F.; PISTONESI, M.; AGULLÓ, E. Emulsification properties of chitosan. **Colloid Polymer Science**, v.276 (12), p.1159-1165, 1998.

SERRANO, M.; FIOR, R.; NEVES, A.; HENRIQUES, A.O. Comunicação inter-celular durante a esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, v.70, p.22-32, 2001.

SERRY, F.M.E.; KADRY, A.A.; ABDELRAHMAN, A.A. Potential biological indicators for glutaraldehyde and formaldehyde sterilization processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.135-140, 2003.

SETLOW, B.; COWAN, A.E.; SETLOW, P. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.637-648, 2003.

SIESS, S.M.; DIVIES, C. Behavior of *Saccharomyces cerevisiae* cells entrapped in a polyacrilamide gel and performing alcoholic fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.10-15, 1981.

SILVA, A.J.; HIRASAWA, J.S.; VARESCHE, M.B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v.12, p.93-98, 2006.

SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. Chitosanases – properties and application: a review. **Bioresource Technology**, v.55, p.35-45, 1996.

TAN, S.C.; KHOR, E.; TAN, T.K.; WONG, S.M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v.45, p.713-719, 1998.

TENNEN, R.; SETLOW, B.; DAVIS, K.L.; LOSHON, C.A.; SETLOW, P. Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.330-338, 2000.

TOLAIMATE, A.; DESBRIERES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VINCENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v.41, p.2463-2469, 2000.

TORRES, M.A.; VIEIRA, R.S.; BEPPU, M.M.; SANTANA, C.C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15 (4), p.306-312, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 8ªed. Artmed, Porto Alegre, 2005, 894p.

TSAI, G.J.; HWANG, S.P. *In vivo* and *in vitro* antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries Science**, v.70, p.675-681, 2004.

VALENTINI, A.; LARANJEIRA, M.C.M.; FIORI, S.; FÁVERE, V.T. Processo alternativo para a remoção de Cobre (II) e Níquel (II) de soluções aquosas utilizando cápsulas de quitosana – álcool polivinílico. **Química Nova**, v.23 (1), p.12-15, 2000.

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

VEJA. Carcinicultura: A Cultura dos Crustáceos. Fevereiro, 2004, Suplemento Especial.

VIEIRA, R.S.; BEPPU, M.M. Dynamic and static adsorption and desorption of Hg(II) ions on chitosan membranes and spheres. **Water Research**, v.40, p.1726-1734, 2006.

VORLOP, K.D.; KLEIN, J. Entrapment of microbial cells in chitosan. **Methods Enzymology**, v.135, p.259-268, 1987.

WANG J.; QIAN Y. Microbial degradation of 4-chlorophenol by microorganisms entrapped in carrageenan-chitosan gels. **Chemosphere**, v.38 (13), p.3109 -3117, 1999.

WEN-TAO, Q.; WEI-TING, Y.; YU-BING, X.; XIAOJUN, M. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate-chitosan-alginate microcapsule. **Biochemical Engineering Journal**, v.25, p.151-157, 2005.

WIENCEK, K.M.; KLAPES, N.A.; FOEGEDING, P.M. Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. **Applied Environmental Microbiology**, v.56 (9), p.2600-2605, 1990.

WILLIAMS, D.; MUNNECKE, D.M. The production of ethanol by immobilized yeasts cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.1813-1825, 1981.

WOODWARD, J. Methods of immobilization of microbial-cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.8, p.91-102, 1988.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v.21(4), p.1329-1334, 2005.

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

ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p.527-530, 2003.

ANEXOS

Trabalhos desenvolvidos durante o Mestrado

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)