

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARIA VALDEREZ PONTE ROCHA

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
USANDO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL

FORTALEZA – CE

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

MARIA VALDEREZ PONTE ROCHA

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
USANDO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA – CE
Fevereiro de 2007

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Azevedo U. Melo CRB-3/572

R574p Rocha, Maria Valdez Ponte

Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional / Maria Valdez Ponte Rocha .

142f., il. color., enc.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 200.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

I. Suco de caju 2. *Pseudomonas aeruginosa* 3. Rhamnolipídios 4. *Bacillus subtilis* 5. Surfactina I. Gonçalves, Luciana Rocha Barros (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título

CDD 660

Aos meus preciosos pais Maria das Graças
(*in memoriam*) e João Carlos (*in
memoriam*), às minhas queridas irmãs
Valdelice e Valderlânia, às minhas tias
Socorro e Irismar, e ao Antônio Arruda
Filho, uma pessoa muito especial.

À vida pelas oportunidades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me dado saúde e disposição para os estudos.

As minhas irmãs, Valdelice e Valderlânia, muito obrigado pelo silêncio quando eu reclamava e obrigado também pelas suas palavras de estímulo quando eu me calava. E principalmente, pela companhia.

A minha mãe e meu pai, que quantas vezes desejei a presença, buscando nas minhas dúvidas e dificuldades o seu apoio, compreensão.

A Profa. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves, por dedicar seu tempo e sua experiência para que minha formação fosse, também, um aprendizado de vida, pela paciência, por todo o conhecimento que me repassou, por acreditar no meu potencial. Meu carinho e homenagem.

A Agência Nacional do Petróleo por ter me concedido essa possibilidade, em especial aos Professores Eurico Belo e Célio Loureiro, por sua dedicação ao PRH-31.

Ao meu namorado Arruda, que em vários momentos estive presente, e que por muitas vezes choramos ou sorrimos juntos, por ter ajudado em muitas análises, por esperar todos os dias eu terminar as tarefas, mesmo que resmungando. À compreensão, por pedir atenção e não lhe dar, devido o “HPLC não deixar”.

Aos meus amigos do GPBIO, “pois na construção de uma peça teatral a presença de todos é imprescindível. Não existirá um cenário, se não houver quem ilumine...”. Álvaro, Cristiane, Germana, George, Gisani, Iraydi, Jame’s, Jocélia, Juliana, Karine, Marcio, Renata, Sofia, Tigressa, Yanna. Em especial as figurinhas: Álvaro e Tigressa.

À Universidade Federal do Ceará, representada pelo Departamento de Engenharia Química, por ter cedido o espaço físico para o desenvolvimento do trabalho.

À Prof. Dra. Vânia Maria Melo, pela amizade, pela paciência, por todo o conhecimento que me repassou, por ter me propiciado realizar ensaios no Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e por ceder os microrganismos estudados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio J. G. Cruz por ter ajudado na construção do biorreator, ter passando seu conhecimento do LabVIEW, como também por sua carícia.

Ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra, da Embrapa Agroindústria Tropical, por ter cedido o Suco de Caju Clarificado utilizado neste trabalho.

A Dra. Fátima Borges da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, por ceder gentilmente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

A Profa. Dra. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira por ser minha conselheira nas horas difíceis e ser alegre nas horas tristes.

A todos os meus colegas do mestrado, que me propiciaram momentos alegres e de fraternidade: Anayla, Antonino, Edson, Elizabete, Gilson, James, Josy, Karine, Leonardo, Mauricio e Murilo.

A duas pessoas que chegaram ao final da execução desta dissertação, mas, que se transformaram em grandes companheiros de trabalho, Dra. Maria Estela Aparecida Giro (uma pessoa bastante especial) e Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.

Ao Professor Dr. Pedro Carlos Oprime, da Universidade Federal de São Carlos do Departamento de Engenharia de Produção, pelas análises estatísticas.

Aos meus ex-colegas de graduação e agora amigos: Alito, Elizabete, Emanuel, Ítalo, Josy, Mororó, Paulo e Paulonelly por proporcionar momentos de descontração.

A Raphaela, Fernanda e Leônia pelo apoio técnico dado a execução deste trabalho, como também pelo companheirismo e amizade. A todos os bolsistas do Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Departamento de Biologia - UFC um forte abraço.

A Michelle, secretária do PRH-31, que sempre com um sorriso resolvia os meus problemas relacionados ao programa ou fazia o impossível para me ajudar. A todos os professores que fizeram parte da minha história educacional, de modo particular aos professores das disciplinas do mestrado, que me abriram novos horizontes dentro da Engenharia Química. Também a todos aos demais professores do DEQ/UFC que de alguma forma me ensinaram a ser um profissional melhor.

*Daqui em diante não peço mais boa-sorte,
Boa sorte sou eu.
Daqui em diante não lamento mais,
Não transfiro, não careço de nada;
Nada de queixas atrás das portas,
De bibliotecas, de tristonhas críticas;
Forte e contente vou eu
Pela estrada aberta
...*

(Walt Whitman - Canto da Estrada Aberta)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactante por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, utilizando suco de caju, integral e clarificado, como matéria-prima não convencional. Nos ensaios com *P. aeruginosa* ATCC 10145 em mesa agitadora, avaliou-se a suplementação do suco de caju integral (CAJN) com óleo de soja, como fonte de carbono, e com diferentes fontes de nitrogênio: peptona, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo estes resultados comparados com os obtidos utilizando caldo nutritivo e com meio CAJN. A maior redução na tensão superficial (41 %) foi obtida no suco de caju suplementado com peptona (CAJP) após 24 h de cultivo. Neste ensaio, observou-se uma redução da tensão superficial do meio de 50 para 29,5 dina cm^{-1} . Já em meio suplementado com NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obteve-se, respectivamente, uma redução na TS de 37,14 e 15,85% após 72 horas de cultivo. Estudou-se a suplementação do meio CAJP com glicerol e óleo de soja. Nestes ensaios, observou-se um alto crescimento celular, obtendo uma densidade óptica (a 600nm) de 5,0 com 48 h de cultivo, contudo uma pequena redução da tensão superficial (16,51 %) ao utilizar glicerol. Com base nos resultados conduzidos em mesa agitadora, os meios CAJP e CAJ NaNO_3 foram selecionados para estudos em fermentador de bancada. Realizaram-se ensaios utilizando biorreator a 30°C, 200 rpm e sem aeração, porém não se observou o mesmo perfil de produção de ramnolipídeos ocorrido em mesa agitadora. Tal fato pode ter ocorrido devido à falta de oxigênio no meio de cultivo. Acompanhou-se a estabilidade térmica, efeito da variação de pH e da concentração de NaCl, na atividade emulsificante do biossurfactante produzido em CAJP e sua composição química. O biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* demonstrou-se estável a variações de temperatura, pH e concentrações de NaCl, e emulsionou todos os hidrocarbonetos estudados e óleo de soja. Em paralelo, diferentes ensaios foram realizados visando otimizar o meio de cultivo para a produção de surfactina por *B. subtilis* usando CAJN e suco de caju clarificado (CAJC). Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou meio mineral suplementado com extrato de levedura e formulado com CAJC, de maneira que a concentração de glicose fosse de 10 g.L⁻¹. Nestes ensaios, obteve-se uma redução de 21,37 % na tensão superficial e observou-se a presença de surfactina através das análises conduzidos em HPLC. No entanto, a mínima tensão superficial alcançada foi superior a 39 dina.cm⁻¹. Portanto, avaliaram-se outras cepas de *B. subtilis*, doze ao total, quanto à capacidade de produzir surfactina utilizando CAJC. Após 48 horas de cultivo com as cepas BE 08, a tensão superficial do meio de cultivo livre de células atingiu 28,0 ± 1,0 dina.cm⁻¹, que também apresentou atividade emulsificante. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o suco de caju é uma matéria-prima adequada para a produção de biossurfactantes.

Palavras-chave: Biossurfactantes, Suco de caju, *Pseudomonas aeruginosa*, Ramnolipídeo, *Bacillus subtilis* e Surfactina

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the use of natural and clarified cashew apple juice as an alternative raw material for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. In the assays with *P. aeruginosa* ATCC 10145 on rotary shaker, the influence of medium (CAJN) supplementation with soybean oil, as source carbon, and with different sources of nitrogen: peptone, NaNO₃ and (NH₄)₂SO₄, were investigated. Results were compared with the obtained when Nutritive Broth (NB) and CAJN were used as culture medium. Maximum reduction in the Surface Tension (41%) was obtained when *P. aeruginosa* was grown on CAJP, after 24 h of cultivate. In these assays, the surface tension was reduced from 50 to 29.5 dina.cm⁻¹. When *P. aeruginosa* was grown on CAJN supplemented with NaNO₃ or (NH₄)₂SO₄, the reduction in the Surface Tension was of 37.14 and 15.85 %, respectively, after 72 h of cultivate. Evaluated CAJP supplemented with glycerol and soybean oil. In these assays, high growth was observed, an optical density of 5,0 at 600 nm with 48h of culture was observed, however small reduction in surface tension (16,51 %) was achieved using glycerol as carbon source. Based on the results in flasks, the mediums CAJP and CAJNaNO₃ were selected for further studies in a biorreator. The assays were conducted in biorreator at 30°C, 200 rpm and without aeration. Nevertheless, the expected profile of rhamnolipids production was not observed. Such fact may have happened due to the lack of oxygen in the cultivation medium, since the process was conducted without aeration. The stability of biosurfactant produced by *P. aeruginosa* in CAJP against NaCl, pH and temperature and its chemical structure were evaluated. The biosurfactante produced by *P. aeruginosa* was stable to temperature and variations, as well as against different NaCl concentrations. Furthermore, it emulsified all the studied hydrocarbons and soybean oil. No protein was detected in the extracted biosurfactant; it however contained carbohydrate. The highest biosurfactant production occurred with 48h, when CAJP was used as culture medium (3.86 g of biosurfactant for 1000 mL de medium) and the poorest in NB. In parallel, different assays were performed to optimize the culture media for surfactin production by *Bacillus subtilis* using CAJN and clarified cashew apple juice (CAJC). Best results were obtained when mineral medium supplemented with yeast extract (5 g.L⁻¹) was used and formulated with CAJC (glucose concentration - 10 g.L⁻¹). In these assays, a reduction of 21.37 % in the surface tension was obtained and production of surfactin was observed by HPLC. However, best results of surface tension were higher than 39 dina.cm⁻¹. Therefore, twelve strains of *Bacillus sp.* were evaluated regarding the ability of producing surfactin when grown on CAJC. After 48 hours of cultivation, with strain BE 08, the surface tension of the fermented broth, free of cells, reached 28.0 ± 1.0 dina.cm⁻¹, and it also presented emulsifying activity. The results obtained in this work indicate that the cashew apple juice is an appropriate raw material for biosurfactants production.

Keywords: Biosurfactants, Cashew apple juice, *Pseudomonas aeruginosa*, Rhamnolipid, *Bacillus subtilis* e Surfactin.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1: Mancha de petróleo em um derramamento no mar.....	04
Figura 2.2: Espécie de ave atingida por um derramamento de navio petroleiro.....	05
Figura 2.3: Rede de contenção usada em derramamento de petróleo.....	05
Figura 2.4: Estrutura de organização das moléculas de tensoativos.....	09
Figura 2.5: Estrutura química do biossurfactante Emulsan produzido por <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	13
Figura 2.6: Soforolipídeos de <i>Torulopsi bombicola</i>	20
Figura 2.7: Estrutura química do ramnolipídios de <i>P. aeruginosa</i>	20
Figura 2.8: Estrutura química da surfactina.....	22
Figura 2.9: Foto do teste de gram da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	23
Figura 2.10: Detalhe das folhas e flores do Cajueiro da família <i>Anacardiaceae</i> e do gênero <i>Anacardium</i> , espécie <i>Anacardium occidentale</i> L	32
Figura 2.11: Caju e Suco de Caju.....	34

CAPÍTULO 3

Figura 3.1: Colônias da bactéria <i>B. subtilis</i> LAMI007 em meio APGE.....	39
Figura 3.2: <i>P. aeruginosa</i> isolada de efluente contaminado com óleo de um navio petroleiro na costa cearense cultivada em meio Ágar Nutritivo.....	39
Figura 3.3: <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 cultivada em meio Ágar Nutritivo.....	39

Figura 3.4: Cromatograma do suco de caju para determinação da concentração de açúcares. Coluna Shodex SC 1011 (8,0 mmID x 30 mmL) e água H₂O (MiliQ) como fase móvel na vazão de 0,6 mL.min⁻¹ a 80°C, injeções de 5 µL.....49

CAPÍTULO 4

Figura 4.1: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em caldo nutritivo: (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH.....57

Figura 4.2: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10: (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◀) Concentração de frutose (g.L⁻¹)..... 57

Figura 4.3: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 e suplementado com óleo de soja 2 % (v/v): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◀) Concentração de frutose (g.L⁻¹).... 58

Figura 4.4: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 suplementado com peptona (5 g.L⁻¹): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◀)Concentração de frutose (g.L⁻¹).....61

Figura 4.5: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 e suplementado com (NH₄)₂SO₄ (5 g.L⁻¹): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◀)Concentração de frutose (g.L⁻¹).....61

Figura 4.6: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 e suplementado com NaNO₃ (5 g.L⁻¹): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◀)Concentração de frutose (g.L⁻¹).....62

- Figura 4.7:** Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral diluído de 1:10, contendo peptona (5g.L⁻¹) e suplementado com glicerol 2% (p/v): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◀) Concentração de frutose (g.L⁻¹).....65
- Figura 4.8:** Atividade Emulsificante (IE₂₄%) do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio suco de caju suplementado com peptona (CAJNP), frente a diferentes substratos: hidrocarbonetos e óleo de soja. Barras de erros representam o desvio padrão.....67
- Figura 4.9:** Emulsificação do querosene pelo biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju suplementado com peptona (CAJNP): (A) 0 hora de cultivo e (B) 24 horas de cultivo.....68
- Figura 4.10:** Cristais do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em CAJNP, recuperado após acidificação do meio livre de células. Foto obtida utilizando microscópio com magnitude de 100x.....68
- Figura 4.11:** Efeito da concentração de NaCl na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJNP a 30°C e 150 rpm.....70
- Figura 4.12:** Efeito do pH na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJNP a 30°C e 150 rpm.....70
- Figura 4.13:** Efeito do tempo de exposição à temperatura de 100°C na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJNP a 30°C e 150 rpm.....71
- Figura 4.14:** Produção de biossurfactante (acompanhado pela diminuição da tensão superficial do meio) e consumo de substrato durante o cultivo de *P. aeruginosa* LAMI, em CAJNaNO₃ no fermentador de bancada de 5 L a 30°C e agitação de 200 rpm.....73
- Figura 4.15:** Perfil da biomassa (A) e do pH (B) em função do tempo durante fermentação a 30°C e 150 rpm por *B. subtilis* LAMI007 nos meios: (▲) caldo nutritivo e (■) suco de caju diluído de 1:10 (v/v).....75

- Figura 4.16:** Variação da tensão superficial do meio livre de células em função do tempo durante a fermentação a 30°C e 150 rpm usando o *B. subtilis* LAMI007 nos meios: (▲) caldo nutritivo e (■) suco de caju 10 % (v/v).....75
- Figura 4.17:** Perfil da biomassa (A) e do pH (B) em função do tempo durante a fermentação a 30°C e 150 rpm utilizando *B. subtilis* LAMI007 em diferentes meios de cultivo: (■) suco de caju integral suplementado com peptona e (●) suco de caju integral suplementado (NH₄)₂SO₄.....76
- Figura 4.18:** Perfil da biomassa em função do tempo durante a fermentação a 30°C e 150 rpm utilizando *B. subtilis* LAMI007 em diferentes meios de cultivo: (●) suco de caju suplementado com (NH₄)₂SO₄ e (■) suco de caju suplementado com (NH₄)₂SO₄, manganês e ferro.....78
- Figura 4.19:** Perfil de biomassa durante a fermentação por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral formulado com diferentes concentrações de glicose proveniente do suco de caju: 0,25, 0,50 e 1,00 g.L⁻¹80
- Figura 4.20:** Perfil da biomassa (A) e do pH (B) ao longo do tempo de fermentação de *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral com: (■) suco de caju clarificado – CAJC e (▲) glicose P.A. (controle) a 30°C e 180 rpm.....81
- Figura 4.21:** Consumo de substrato durante fermentação por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral formulado com CAJC e com glicose P.A. (controle) a 30°C e 180 rpm.....81
- Figura 4.22:** Cromatograma das análises da surfactina, realizadas por cromatografia, com a coluna Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm, Water, Irlanda) e a fase móvel de 20 % de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ a temperatura ambiente. (A) Surfactina bruta obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio MM-CAJC. (B) Surfactina purificada obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio MM-CAJC. (C) Surfactina padrão – Sigma (0,2 mg.L⁻¹).....82
- Figura 4.23:** Perfil da biomassa (A) e pH (B) durante fermentação por *B. subtilis* LAMI007, a 30°C e 180 rpm, em meio mineral suplementado com extrato de levedura,

usando os meios: (●) MM-CAJC, (▲) glicose PA e (□) sacarose PA como fonte de carbono.....84

Figura 4.24: Consumo de substrato durante a fermentação para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007, a 30°C e 180 rpm, em meio mineral suplementado com extrato de levedura (5 g.L⁻¹) e formulado com: CAJC ((■)glicose e (▲)frutose); (▲) sacarose e (●) glicose como fonte de carbono.....85

Figura 4.25: Cromatograma das análises da surfactina. Coluna Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm, Water, Irlanda) e a fase móvel de 20 % de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ e temperatura ambiente. (A) Surfactina bruta obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio de cultivo MM-CAJC suplementado com extrato de levedura (5 g.L⁻¹). (B) Surfactina purificada obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio de cultivo MM-CAJC suplementado com extrato de levedura (5 g.L⁻¹). (C) Surfactina padrão (0,2 mg.mL⁻¹)87

Figura 4.26: Índice de Emulsificação (IE_{24%}) do querosene pelo biossurfactante produzido por fermentação de meio mineral contendo extrato de levedura e CAJC como fonte de carbono, a 30°C utilizando *B. subtilis* LAMI007.....88

Figura 4.27: Espectro infravermelho de uma amostra comercial de surfactina produzido por *B. subtilis*.....89

Figura 4.28: Espectro infravermelho da surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral com CAJC suplementado com extrato de levedura.....90

Figura 4.29: Gráfico do intervalo de confiança do *screening* para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus* isoladas.....91

Figura 4.30: Histograma dos Resíduos do *screening* para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus* isoladas.....93

Figura 4.31: Emulsificação de querosene pelas cepas de *Bacillus*: (A) LAMI002 e (B) LAMI008.....95

Figura 4.32: Emulsificação de gasolina pelas cepas de *Bacillus*: (A) LAMI012; (B)

LAMI007 e (C) LAMI010.....95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1: Fatores que afetam a degradação do Petróleo.....	07
Tabela 2.2: Toxicidade de biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos....	12
Tabela 2.3: Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.....	12
Tabela 2.4: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.....	14
Tabela 2.5: Comparação da tensão superficial e CMC entre biossurfactantes e surfactantes sintéticos.....	16
Tabela 2.6: Estudos de produção de ramnolipídeos por <i>P. aeruginosa</i>	25
Tabela 2.7: Estudos feitos com matérias-primas não convencionais para a produção de biossurfactantes.....	31
Tabela 2.8: Processos <i>downstream</i> para a recuperação de biossurfactantes.....	36

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1: Composição do meio mineral (MM).....	40
Tabela 3.2: Composição da solução de micro nutriente.....	40
Tabela 3.3: Meios de cultivo utilizados para o crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 e produção de biossurfactantes.....	44

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1: Composição do suco de caju integral.....	53
Tabela 4.2: Composição do suco de caju clarificado.....	54

Tabela 4.3: Aminoácidos presentes no suco de caju integral (CAJN) e clarificado (CAJC) utilizados como substrato para a produção de biossurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Bacillus subtilis</i> , respectivamente.....	55
Tabela 4.4: Influência do meio de cultivo no crescimento da cepa <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145.....	59
Tabela 4.5: Influência do meio de cultivo no crescimento e produção de biossurfactante por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145: caldo nutritivo (CN), suco de caju diluído de 1:10 (CAJN) e suco de caju diluído de 1:10 e suplementado com óleo de soja (CAJNS).....	60
Tabela 4.6: Efeito da suplementação do suco de caju com diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e produção de biossurfactante por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145. Meios de cultura: caldo nutritivo (CN), suco de caju diluído 1:10 (CAJN), Suco de caju diluído 1:10 e suplementado com 5 g.L ⁻¹ de peptona (CAJNP), suco de caju diluído 1:10 e suplementado com 5 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ (CAJNH ₄) e suco de caju diluído 1:10 e suplementado com 5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ (CAJNaNO ₃).....	63
Tabela 4.7: Influência da suplementação do meio de cultivo CAJNP com diferentes fontes de carbono (glicerol e óleo de soja) no crescimento e produção de biossurfactante por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145.....	66
Tabela 4.8: Produção de biossurfactante por <i>P. aeruginosa</i> em fermentador de bancada de 5 L de volume útil a 30°C e 200 rpm, utilizando dois meios de cultivo: suco de caju integral, diluído para se obter uma concentração inicial de glicose de 5 g.L ⁻¹ , suplementado com 5 g.L ⁻¹ de peptona (CAJP) e suco de caju integral, diluído para se obter uma concentração inicial de glicose de 5 g.L ⁻¹ de glicose, suplementado com 5 g.L ⁻¹ de NaNO ₃ (CAJNaNO ₃).....	72
Tabela 4.9: Influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por <i>B. subtilis</i> LAMI007 em suco de caju. Meios de cultivo: suco de caju integral (CAJN), suco de caju integral suplementado com peptona (CAJNP), suco de caju integral suplementado com (NH ₄) ₂ SO ₄ (CAJNNH ₄).....	77
Tabela 4.10: Efeito da adição de micro nutriente na produção de biossurfactante por	

<i>B. subtilis</i> LAMI007 no meio de cultivo CAJNNH ₄	79
Tabela 4.11: Produção de biossurfactante por <i>B. subtilis</i> LAMI007 em meio mineral formulado com suco de caju (MM-CAJC) e com glicose P.A. a 180 rpm e 30°C.....	82
Tabela 4.12: Efeito da presença de extrato de levedura e de diferentes fontes de carbono na produção de biossurfactante por <i>B. subtilis</i> LAMI007 em meio mineral...86	86
Tabela 4.13: Avaliação da produção de biossurfactantes por cepas de <i>Bacillus</i> isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará. Comparação da tensão superficial obtida após 48 horas de cultivo em meio mineral contendo 10 g.L ⁻¹ de glicose proveniente do CAJC, a 180 rpm e 30°C.....	91
Tabela 4.14: Tabela de Análise de Variância (ANOVA) para o <i>screening</i> de produção de biossurfactante por diferentes cepas de <i>Bacillus</i>	92
Tabela 4.15: Dados das análises estatísticas do <i>screening</i> para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de <i>Bacillus</i> isoladas.....	92
Tabela 4.16: Avaliação da atividade de emulsificação de gasolina e querosene dos produtos de fermentação das cepas de <i>Bacillus</i> isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, após 48 horas de cultivo em meio mineral contendo 10 g.L ⁻¹ de glicose proveniente do CAJC e 5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura, a 180 rpm e 30°C.....	94

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. Petróleo e seus impactos ambientais.....	04
2.2. Biodegradação do Petróleo.....	05
2.3. Biorremediação.....	07
2.4. Tensoativos.....	09
2.5. Biossurfactantes.....	10
2.5.1. Classificação e natureza química dos biossurfactantes.....	12
2.5.2. Propriedades dos biossurfactantes.....	13
2.5.3. Biossurfactantes e Tensão Superficial.....	15
2.5.4. Aplicações Industriais.....	17
2.5.4.1. Biorremediação.....	17
2.5.4.2. Limpeza de reservatórios de óleos.....	18
2.5.4.3. Recuperação melhorada do petróleo (MEOR).....	18
2.5.4.4. Aplicações terapêuticas.....	19
2.5.4.5. Outras aplicações.....	19
2.6. Ramnolipídeos.....	20
2.7. Surfactina.....	22
2.8. Características Morfológicas e Fisiológicas das bactérias utilizadas neste trabalho.....	23
2.8.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	23
2.8.2. <i>Bacillus subtilis</i>.....	23
2.9. Produção de Biossurfactantes: Condições e Meio de Cultivo.....	24
2.10. Produção de Biossurfactantes utilizando substratos não convencionais.....	28
2.11. Suco de Caju como Matéria-Prima Não-Convencional.....	31
2.12. Extração e Purificação de Biossurfactantes.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38

3.1. Materiais	38
3.1.1. Matéria-Prima	38
3.1.2. Microrganismos	38
3.1.3. Meios de Cultura	40
3.1.3.1. Meio de Manutenção	40
3.1.3.2. Meio de propagação do inóculo	40
3.2. Métodos	41
3.2.1. Preparação e caracterização da Matéria-Prima	41
3.2.1.1. Preparação do Suco de Caju Integral	41
3.2.1.2. Caracterização do Suco de Caju (Integral e Clarificado)	41
3.2.2. Esterilização dos Meios de Cultura	42
3.2.3. Propagação do inóculo	42
3.2.3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
3.2.4.3. <i>Bacillus subtilis</i>	42
3.2.4. Ensaios preliminares de crescimento e produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> em suco de caju	43
3.2.5. Produção de Biossurfactantes em mesa agitadora	43
3.2.5.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	43
3.2.5.2. <i>Bacillus subtilis</i> LAMI007	44
3.2.6. Produção de Biossurfactantes em fermentador de bancada	45
3.2.7. Extração e Purificação do Biossurfactante	45
3.2.7.1. Biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	45
3.2.7.2. Biossurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> LAMI007	46
3.2.8. Determinação do Efeito de NaCl, temperatura e pH na atividade do Biossurfactante	46
3.2.8.1. Estabilidade frente à força iônica	46
3.2.8.2. Estabilidade frente a pH	47
3.2.8.3. Estabilidade frente à temperatura	47
3.2.9. Métodos Analíticos	47
3.2.9.1. pH do meio de cultivo	47
3.2.9.2. Concentração de Biomassa	47
3.2.9.3. Contagens de células viáveis	48

3.2.9.4. Determinação da concentração de Açúcares Totais.....	48
3.2.9.5. Determinação da concentração de Glicose, Frutose e Sacarose.....	49
3.2.9.6. Determinação do biossurfactante.....	49
3.2.9.6.1. Determinação do Índice de Emulsificação.....	49
3.2.9.6.2. Determinação da tensão superficial.....	50
3.2.9.7. Determinação da concentração de surfactina.....	50
3.2.9.8. Caracterização Química do Biossurfactante.....	51
3.2.9.8.1. Cromatografia de Camada Delgada.....	51
3.2.9.8.2. Determinação de Carboidratos e Proteínas.....	51
3.2.9.8.3. Espectroscopia de Infravermelho.....	51
3.2.10. <i>Screening</i> para avaliar a produção de surfactina com diferentes cepas de <i>Bacillus</i> isoladas.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
4.1. Caracterização do Suco de Caju.....	53
4.2. Produção e Caracterização de Biossurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
4.2.1. Estudos iniciais em frascos agitados.....	56
4.2.2. Influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	60
4.2.3. Influência da suplementação do meio CAJNP com diferentes fontes de carbono na produção de biossurfactante por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	64
4.2.4. Caracterização do biossurfactante produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145.....	66
4.2.5. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por fermentação de CAJNP por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a variações de pH, temperatura e concentração de NaCl.....	69
4.2.6. Produção de biossurfactantes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LAMI em fermentador de bancada.....	72
4.3. Produção de Biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI007.....	74
4.3.1. Ensaios iniciais de crescimento e produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI007 utilizando suco de caju integral com substrato.....	74

4.3.2. Influência da suplementação do suco de caju integral com fontes de nitrogênio na produção de biosurfactante utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI007.....	76
4.3.3. Influência da adição de micro nutrientes ao suco de caju integral na produção de biosurfactantes utilizando <i>Bacillus subtilis</i> LAMI007.....	77
4.3.4. Avaliação da produção de biosurfactante por fermentação em meio mineral e suco de caju clarificado (CAJC) por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI007.....	79
4.3.5. Avaliação da influência de extrato de levedura na produção de biosurfactante por <i>Bacillus subtilis</i> LAMI007 usando meio mineral formulado com suco de caju clarificado.....	83
4.3.6. Caracterização do biosurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> LAMI007.....	88
4.3.7. Seleção de cepas de <i>Bacillus</i> com maior potencial de produção de biosurfactantes utilizando Suco de Caju clarificado como matéria-prima.....	90
5. CONCLUSÕES.....	96
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXO A.....	114
ANEXO B.....	122

1. INTRODUÇÃO

As atividades relacionadas à indústria do petróleo envolvem grandes riscos ambientais, face à possibilidade de contaminação do ar, dos solos e das águas por uma gama de compostos orgânicos altamente poluentes. Os riscos vão desde a extração até o consumo, sendo que os danos mais graves acontecem, geralmente, durante o transporte de combustível, devido a vazamentos de oleodutos e navios petroleiros.

Atualmente, as soluções mais utilizadas para resolver problemas de derramamento de óleo compreendem a utilização de substâncias químicas dispersantes, coagulantes e/ou uso de redes de contenção de óleo. Contudo, essas práticas além de não serem muito eficientes, apresentam custos elevados. Uma alternativa atraente é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos (ou de seus produtos) capazes de degradar o petróleo e/ou seus derivados. Geralmente, esses microrganismos atacam os poluentes com o auxílio de biossurfactantes que eles produzem.

Tensoativos ou surfactantes constituem uma importante classe de produtos químicos amplamente utilizados em vários setores industriais. São substâncias que possuem ação superficial, devido às suas características anfifílicas (presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos numa mesma molécula). Os surfactantes de origem microbiana ou biossurfactantes são uma alternativa aos tensoativos sintéticos, apresentando inúmeras vantagens em relação a estes: biodegradabilidade, baixa toxicidade e podem atuar em condições mais drásticas de temperatura ou pH (Banat *et al.*, 2000). Segundo Santa Anna (2002), a indústria do petróleo é o maior mercado para a utilização de biossurfactantes. Estes agentes tensoativos biodegradáveis vêm sendo utilizados em sistemas de controle de poluição do meio ambiente em derramamentos de petróleo e seus derivados, visto que aumentam a biodisponibilidade dos contaminantes (Desai e Banat, 1997). Além desta aplicação, podem ser utilizados como meio de aumentar a produção de poços de petróleo, limpeza de tanques, fabricação de películas ultrafinas, processamento químico de papel, etc. (Nitschke e Pastore, 2002). As indústrias de medicamentos, alimentos, cosméticos, detergentes para roupas, agentes processadores de minério, entre outras, também têm se beneficiado das propriedades dos agentes tensoativos.

Do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes químicos, principalmente devido ao seu alto custo (Banat *et al.*, 2000) associado a processos ineficientes de recuperação e purificação (Fox e Bala, 2000, Rocha *et al.*, 2006). Porém, o uso de substratos alternativos como, resíduos agroindustriais, podem contribuir para a redução de custos, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 30 % do valor do produto final (Makkar e Cameotra, 1999). O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos envolve a seleção de um substrato que contenha um balanço correto de nutrientes que suportem tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse (Nistchke e Pastore, 2006). Outras dificuldades importantes são: a padronização e os custos com transportes, armazenagem e tratamento prévio.

No Estado do Ceará, por exemplo, o problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo, como, por exemplo, o pedúnculo do caju. A agroindústria do caju contribui de forma relevante para a pauta das exportações nordestinas e, sem dúvida, é o setor mais importante da economia regional. No entanto, apenas uma pequena parte do pedúnculo produzido é aproveitada industrialmente, em torno de 2 a 6 % (Morton (1997); Campos *et al.* (2002); Assunção e Mercadante (2003)). A quantidade desperdiçada (92 a 94 %) apresenta elevado potencial, por ser matéria-prima rica em carboidratos (açúcar e amido), fibras, vitaminas e sais minerais. A alta taxa de desperdício do pedúnculo do caju ocorre principalmente devido a sua extrema perecibilidade e à ausência de técnicas de manuseio e preservação adequadas. Ademais, a intensa adstringência do pedúnculo, causada pela presença de polifenóis (taninos), e a formação de duas fases no interior das garrafas de suco são fatores que diminuem a aceitação deste produto no mercado externo (Assunção e Mercadantes, 2003). Desta forma, o estudo da utilização de pedúnculo do caju como meio de cultura para o crescimento celular e, conseqüente, obtenção de produtos de alto valor agregado pode indicar rotas econômicas alternativas para as regiões produtoras de caju. Sendo matéria-prima rica em açúcares, fibras, vitaminas e sais minerais, pode-se considerar o pedúnculo de caju como uma matéria-prima nobre para diversas aplicações. Podemos citar, por exemplo, a produção de biossurfactantes.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem biossurfactantes, especificamente ramnolipídeos, que têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial contra n-hexadecano para 1 dina.cm^{-1} e a tensão superficial para 25 a 30 dina.cm^{-1} (Lang e Wagner, 1987). Além de reduzirem a tensão superficial, estabilizam emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (Desai e Banat, 1997). Os ramnolipídeos também são fonte de L-ramnose, que é usada para a produção industrial de aromatizantes de alta qualidade (Lang e Wullbrandt, 1999). Após testes iniciais, os ramnolipídeos mostraram um potencial de aplicação no combate à poluição marinha causada por derramamento de óleos, na remoção de óleos em areia e no combate a zoósporos fitopatogênicos (Lang e Wullbrandt, 1999).

Algumas espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas pela sua capacidade de produzir compostos com propriedades tensoativas, dentre estes, destaca-se a surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, considerada como um dos mais potentes biossurfactantes já conhecidos (Nitschke e Pastore, 2002). Surfactina também apresenta propriedade antimicrobiana (Vollenbrioch *et al.*, 1997a) e antiviral (Vollenbrioch *et al.*, 1997b).

Neste contexto, esta Dissertação de mestrado propõe o estudo de um processo fermentativo que permita a obtenção de biossurfactantes utilizando como substrato alternativo, pedúnculo de caju, por se tratar de matéria-prima abundante e de baixo valor comercial no estado do Ceará. A metodologia a ser empregada envolve a caracterização deste insumo, a seleção de microrganismos adequados, o levantamento cinético da fermentação e bem como a caracterização do produto obtido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Petróleo e seus impactos ambientais

Explorado comercialmente desde meados do século XIX, o petróleo foi usado, por muitas décadas, para a iluminação e em menor escala, como lubrificante. A invenção do motor de combustão interna e sua adoção rápida em todas as formas de transporte ampliaram o emprego desse recurso natural, aumentando a demanda e com isso a produção, o transporte, a estocagem e a distribuição tanto do óleo cru quanto de seus derivados. Todas essas atividades envolvem riscos de derrames acidentais, que podem ser minimizados, mas não totalmente eliminados (Crapez *et al.*, 2002). Felizmente, os grandes derrames, que contaminam oceanos e áreas costeiras de forma significativa, não ocorrem com frequência (Figura 2.1). Como exemplo desses desastres ambientais pode-se citar as 200 mil toneladas de óleo despejadas na costa da França pelo acidente com o navio petroleiro Amoco Cadiz em 1978, (Acidentes ambientais - CETESB, 2003).



Figura 2.1: Mancha de petróleo em um derramamento no mar (Crapez *et al.*, 2002).

A poluição por petróleo e seus derivados, em ambientes marinhos, tem sido um dos principais problemas ambientais das últimas décadas (Figura 2.2). Diversas técnicas físicas e químicas foram desenvolvidas para a retirada do petróleo derramado no mar ou para a redução dos seus efeitos sobre o ecossistema, como rede de contenções (Figura 2.3). A descoberta de

certas bactérias que vivem nos sedimentos marinhos, inclusive na areia das praias, e que podem degradar os componentes do petróleo, abriu a possibilidade de usar métodos biológicos para o tratamento dos derrames. Esses métodos, objeto de pesquisas recentes no Brasil, são chamados, em seu conjunto, de biorremediação (Crapez *et al.*, 2002).



Figura 2.2: Espécie de ave atingida por um derramamento de navio petroleiro.
(Acidentes ambientais - CETESB, 2003).



Figura 2.3: Rede de contenção usada em derramamento de petróleo.

2.2 Biodegradação do Petróleo

Em 1946, o microbiólogo marinho norte-americano Claude E. Zorbell identificou, pela primeira vez, microrganismos capazes de consumir petróleo, isto é, de usá-lo como fonte de

carbono para a geração de biomassa. Na época, porém, os derrames de petróleo ainda não eram vistos como um problema ambiental sério. Apenas 21 anos depois, em 1967, o acidente com o superpetroleiro Torrey Canyon, na Inglaterra, e o desenvolvimento da exploração do petróleo no Ártico serviram de alerta para o risco de outros acidentes (Crapez, *et al.*, 2002).

A partir daí, os cientistas passaram a se preocupar com o destino do petróleo poluente e uma atenção especial foi dada ao ambiente marinho. Pesquisas desenvolvidas desde então procuravam respostas para diversos questionamentos sobre: os componentes biodegradáveis do petróleo; fatores ambientais que influenciaram a biodegradação dessa substância e distribuição das populações de microrganismos capazes de degradar o petróleo.

O petróleo, formado por processos biogeoquímicos, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Sua composição varia em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram. Assim, grande parte de seus componentes (60 a 90 %) é passível de biodegradação. Entretanto, o restante é recalcitrante, isto é, demora a desaparecer por meios naturais, após algum acidente num ambiente. A degradação do petróleo é afetada por diversos fatores, como se pode visualizar na Tabela 2.1. Mesmo se tratando de uma fração menor, é preciso lembrar que isso significa toneladas de material poluente e pode ser bioacumuladas nos seres vivos. Assim, o destino dessa substância dependerá da interação de vários fatores como, por exemplo, da biodegradação (Crapez *et al.*, 2002). Pesquisas mostraram que diversos grupos de bactérias e fungos têm habilidade para degradar os componentes do petróleo. As bactérias, denominadas hidrocarbonoclásticas, fazem parte da microflora presente no solo, na água e no sedimento. Quando esses ambientes são expostos às marés negras, ocorre um fenômeno de adaptação ou aclimação de certas bactérias, que passam a reconhecer os componentes do óleo como fonte de carbono, iniciando o processo de degradação (Crapez *et al.*, 2002).

Tabela 2.1: Fatores que afetam a degradação do petróleo.

Fatores	Características
Composição Química	Cerca de 60 a 90 % são hidrocarbonetos alifáticos, passíveis químicas de biodegradação. Nessa classe, o fitano e o pristano são mais resistentes à degradação e podem ser usados como marcadores químicos em monitoramento. Entre os aromáticos, deve-se monitorar benzeno, tolueno e xileno (BTX), mais tóxicos aos seres vivos. Nos seres vivos, o petróleo pode ser incorporado às gorduras, causar distúrbios metabólicos ou interromper a quimiorrecepção.
Estado Físico	Condicionamento, agregação, espalhamento, dispersão ou adsorção no ambiente.
Mudanças Químicas	A composição química e o estado físico do óleo, associado à temperatura, à radiação solar e ao batimento das ondas, induzem mudanças químicas, evaporação e foto oxidação.
Água	É essencial à vida bacteriana, mas é excluído dos agregados devido o petróleo ser hidrofóbico.
Temperatura	Determina a evaporação, constituindo um fator importante no processo de degradação.
Oxigênio	É fator decisivo para iniciar e sustentar a biodegradação.
Nutrientes	São essenciais nitrogênio (N) e fósforo (P). Teoricamente, para cada grama de óleo degradado são necessários 150 mg de nitrogênio e 30 mg de fósforo.
Salinidade	É desconhecida a biodegradação em ambientes hipersalinos.
Microrganismos	As bactérias hidrocarbonoclasticas podem estar ausentes ou em número insuficiente para desencadear a biodegradação.

Fonte: Crapez *et al.*, 2002.

2.3. Biorremediação

A biorremediação é uma técnica que vem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos conhecidos no tratamento de rejeitos potencialmente tóxicos,

incluindo hidrocarbonetos de petróleo, é uma prática habitual em alguns países desenvolvidos. Os sistemas biológicos geralmente utilizados são microrganismos e plantas. No entanto, a biodegradação com microrganismos é a opção mais frequentemente empregada (Macedo *et al.*, 2002).

De forma simplificada, a biorremediação consiste no uso de microrganismos naturais como bactérias, fungos e leveduras para degradar substâncias, muitas vezes perigosas para os seres humanos, transformando-as em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade, principalmente dióxido de carbono e água. Os microrganismos, da mesma forma que os seres humanos, utilizam substâncias orgânicas, das quais obtêm nutrientes e energia. Após degradar os contaminantes (combustíveis, solventes, petróleo, etc.), a população de microrganismos volta aos níveis normais da população microbiana antes do derramamento, uma vez que se esgota sua fonte de alimentos (Macedo *et al.*, 2002). Diferentes microrganismos degradam diferentes substâncias e alguns sobrevivem em condições extremamente adversas (Crapez *et al.*, 2002).

As medidas biocorretivas visam aumentar a população microbiana criando condições ambientais propícias para o seu desenvolvimento e sua utilização. Essas medidas dependerão de vários fatores, dentre eles os tipos de microrganismos presentes, as condições do local como pH, água no solo, quantidade de nitrogênio, potássio, fosfato, a quantidade e a toxicidade dos contaminantes.

As medidas biocorretivas podem ser usadas para descontaminação de solo e água e são classificadas em duas grandes categorias: *in situ* e *ex situ*. No caso das medidas *in situ*, o tratamento da terra contaminada ou da água subterrânea é feito no próprio local. As medidas biocorretivas *ex situ* consistem em escavar o solo contaminado ou extrair a água subterrânea por bomba para aplicar o tratamento em outro local (Geoscience Technologies, 2003).

O grau de biodegradação depende principalmente da toxicidade, da concentração inicial de contaminantes, das propriedades do solo contaminado e do tipo de tratamento aplicado. Os contaminantes passíveis de biodegradação são compostos orgânicos não halogenados, voláteis e semivoláteis, petróleo bruto, combustíveis e solventes. A eficácia das medidas biocorretivas é limitada em locais com alta concentração de metais, compostos orgânicos altamente clorados e sais inorgânicos, pois esses compostos são bastante tóxicos para os microrganismos (Geoscience Technologies, 2003).

2.4. Tensoativos

Tensoativos ou surfactantes são substâncias (como por exemplo, um detergente) que quando adicionadas aos líquidos aumentam a sua capacidade de espalhamento e de umectação através da redução da tensão superficial.

As moléculas dos tensoativos são constituídas por uma parte polar solúvel em água (porção hidrofílica) e uma parte apolar (lipofílica) solúvel em óleo. A porção apolar é freqüentemente uma cadeia de hidrocarbonetos enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera (Desai e Banat, 1997). Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico).

Devido às características da sua molécula, os tensoativos tendem a se posicionar e a se orientar na superfície limite entre duas fases como: água/óleo, água/ar e óleo/ar (Figura 2.4), tornando miscíveis duas fases imiscíveis como, por exemplo, água e óleo. Devido às características dos tensoativos, espera-se que ocorra uma diminuição da tensão superficial com o aumento da concentração. A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração para a qual a tensão superficial é mínima. Após ocorrer a saturação da interface, as moléculas de tensoativo migram para o interior da solução formando micelas e o valor da tensão superficial não mais sofre alterações (Wittcoff e Reuben, 1980).

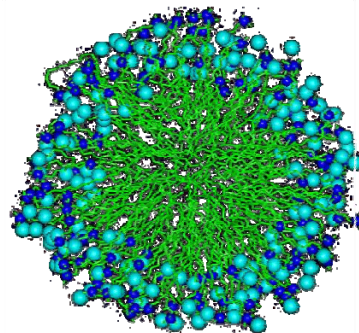


Figura 2.4: Estrutura de organização das moléculas de tensoativos (Nitschke e Pastore, 2002).

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, com o crescimento

da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais, como alternativa aos produtos já existentes (Nitschke e Pastore, 2002).

O capital envolvido na indústria dos surfactantes está em torno de 9,4 bilhões de dólares por ano (Shaw, 1994), e sua demanda está estimulada a crescer a uma taxa de 35 % (Greek, 1991). Atualmente, nos países industrializados 70-75 % dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam (Bognolo, 1999). Entretanto, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é movida pela necessidade de produtos mais brandos, pela necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis e pelo aumento da especificidade dos produtos.

2.5. Biossurfactantes

Segundo vários autores (Bognolo, 1999; Desai e Banat, 1987; Nitschke e Pastore, 2002) os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras.

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

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolípídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolípídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Desai e Banat, 1997).

Conforme Nitschke e Pastore (2002), algumas células microbianas apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como biossurfactantes, como por exemplo, bactérias do gênero *Acinetobacter sp.* Estes microrganismos produzem vesículas

extracelulares que tem função importante na captação de alcanos para a célula, possuindo elevada atividade surfactante. As vesículas e células microbianas com atividade surfactante são classificadas como biossurfactantes particulados.

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tais como: baixa toxicidade (Tabela 2.2), alta biodegradabilidade, elevada compatibilidade ambiental e efetividade em condições extremas de temperatura, pH e força iônica. Estas características permitem a sua utilização em uma gama de aplicações industriais (Lima Lobato *et al.*, 2002 e Cameotra e Makkar, 1998). Entretanto, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo (Rocha *et al.*, 2006).

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

O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos envolve a seleção de um substrato que contenha um balanço correto de nutrientes que suportem tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse. (Nistchke e Pastore, 2006). Outras dificuldades importantes são: a padronização e os custos com transportes, armazenagem e tratamento prévio (Mercades e Manresa, 1994).

Kosaric *et al.* (1984) sugeriram quatro fatores para redução dos custos: os microrganismos (seleção, adaptação ou aumentar o rendimento do produto); o processo (seleção, adaptação ou diminuir o capital e os custos com operação), o substrato (que propicie um maior crescimento microbiano) e a separação do produto (minimizar os resíduos da separação, como solventes utilizados na extração).

Tabela 2.2: Toxicidade de biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos.

Natureza do Surfactante	Surfactante	*CE50 (mg.L⁻¹)
Biológico	<i>Rhodococcus rubber</i> AC 235 – glicolípido	650
Biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> – trealose dicorinomicolat	49
Biológico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ramnolípido	50
Sintético	Acetato de nonilfenol-(óxido de etileno)-9 (EQ9)	78
Sintético	Estearato de sacarose (DK50)	67
Sintético	Finasol OSR	57
Sintético	Inipol EAP 22	0,004

*CE – concentração efetiva onde 50% dos microrganismos morrem.

Fonte: Mesquita, 2004.

2.5.1 Classificação e natureza química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais (Tabela 2.3), sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.

Tabela 2.3: Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética.

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betaínas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno

Fonte: Nitschke e Pastore, 2002.

Os biossurfactantes poliméricos são constituídos por diversos grupos químicos diferentes como, por exemplo, o emulsan (Figura 2.5), no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos (Desai e Banat, 1997), ou o liposan de *Candida lipolytica*, constituído por carboidratos e proteínas (Cirigliano e Carman, 1984).

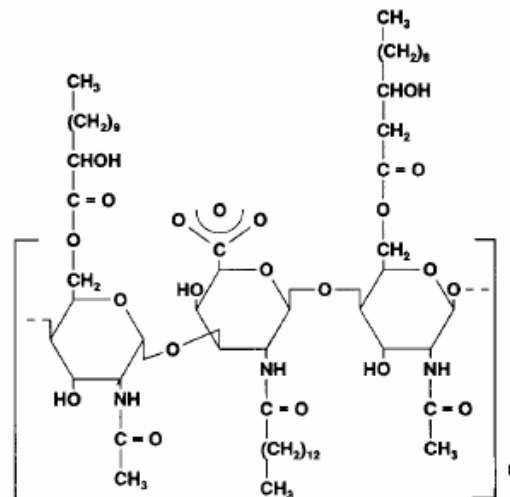


Figura 2.5: Estrutura química do biossurfactante Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*. (Desai e Banat, 1997).

Os biossurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Bognolo, 1999; Cameotra e Makkar, 1998). A maioria dos biossurfactantes são neutros ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. As principais classes de biossurfactantes e microrganismos produtores podem ser encontrados na Tabela 2.4.

2.5.2 Propriedades dos biossurfactantes

Os biossurfactantes, apesar da diversidade de composição química e propriedades, apresentam algumas características comuns e estas representam vantagens sobre os surfactantes convencionais.

Os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em

menores concentrações de biossurfactante (Nitschke e Pastore, 2002). Segundo Mulligan e Gibbs (1993), a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg.L⁻¹, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 dina.cm⁻¹ respectivamente.

Tabela 2.4: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
Ramnolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola, Torulopsis apicola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus, Candida lipolytica</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica, Pseudomonas fluorescens</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Fonte: Desai e Banat, 1997.

Alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. Diferentes dos surfactantes químicos,

os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (Horowitz *et al.*, 1990). Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl, enquanto uma concentração salina de 2 a 3 % é suficiente para inativar surfactantes convencionais (Bognolo, 1999).

Os biossurfactantes apresentam baixa toxicidade comparada aos sintéticos, por isso eles têm recebido maior atenção como também, devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (Cameotra e Makkar, 1998); além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Flasz *et al.*, 1998).

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (Lin *et al.*, 2002). Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência. Outra vantagem reside no fato de serem compostos não derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. A possibilidade de modificação da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas permite o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas (Desai e Banat, 1997).

2.5.3 Biossurfactantes e Tensão Superficial

A tensão superficial é definida como a força que age na superfície de um líquido promovendo a minimização da área superficial. Tanto os surfactantes sintéticos como os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 dina.cm^{-1} , a temperatura ambiente, para valores na faixa entre 47 e 27 dina.cm^{-1} (Desai e Banat, 1997).

A tensão superficial na interface ar/água e óleo/água (freqüentemente referida como tensão superficial e tensão interfacial, respectivamente) é facilmente medida utilizando, por exemplo, um tensiômetro de Du Nouy (Parkinson, 1985).

Segundo Parkinson (1985), a eficiência de surfactante é caracterizada em termos do efeito da concentração deste na tensão superficial. Tipicamente, e para uma primeira

aproximação, aumentando a concentração de biossurfactante a um valor característico, conhecido como concentração micelar crítica (CMC) não se obtém resultados significantes na diminuição da tensão superficial. Concentrações mais altas que a CMC, supõe que moléculas adicionais de surfactantes agreguem a micela na fase e não contribui significantemente para promover mudanças na interface. A Tabela 2.5 apresenta valores de tensão superficial e CMC para surfactantes sintéticos e biológicos.

Tabela 2.5: Comparação da tensão superficial e CMC entre biossurfactantes e surfactantes sintéticos.

Natureza do Surfactante	Surfactante	Tensão Superficial (dina.cm ⁻¹)	CMC (mg.L ⁻¹)
Biológico	<i>Rhodococcus rubber</i> – glicolípídeo	26,8	54
Biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> – trealose dicorinomicolato	36	4
Biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> – trealose tetraester	26	15
Biológico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ramnolípídeo	29	50-200
Biológico	<i>Torulopsis bambicola</i> – soforolípídeo	33	82
Biológico	<i>Bacillus subtilis</i> – surfactina	27	23
Sintético	Dodecil Sulfonato de Sódio (SDS)	37	2120
Sintético	Brometo de Cetiltrimetilamônio	30	1300
Sintético	Tween 20	30	600
Sintético	n-Alquil Benzeno Sulfonato	47	590

Fonte: Mesquita, 2004.

As medidas de tensão superficial são comumente usadas para monitorar o crescimento microbiano e existe uma grande quantidade de informações na literatura sobre tensão superficial e propriedades de emulsificação para alguns microrganismos. Contudo, é difícil comparar os dados publicados com um microrganismo específico, pois o crescimento e a produção de surfactante estão associados ao meio de cultura, pH, fonte de carbono e aeração. Uns dos fatores que controlam a produção de biossurfactante são: a qualidade e a quantidade da fonte de carbono (solúvel em água, hidrocarbonetos ou óleos) e nitrogênio (NH₄⁺, NO₃⁻, uréia ou aminoácidos) no meio de cultura ou ambiente natural (Mesquita, 2004).

2.5.4 Aplicações Industriais

Um número de aplicações industriais de biossurfactante tem sido investigado (Desai *et al.*, 1994). O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, no qual não requer alto grau de pureza, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais.

2.5.4.1. Biorremediação

Como os biossurfactantes apresentam a capacidade de aumentar a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos (Banat, 1995). A capacidade dos biossurfactantes, em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água, aumentam a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes, entretanto, os estudos ainda ocorrem a nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biossurfactantes permanece ainda como um desafio (Atlas, 1991), apesar dos acidentes com derramamento de óleo terem se tornados numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais.

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Segundo Mesquita (2004), o uso de biossurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. A degradação de hexaclorociclohexano por surfactante produzido por *Pseudomonas* foi relatada, sendo que outros organoclorados e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau (Mesquita, 2004). Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo. Bognolo (1999) relatou que surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas.

2.5.4.2. Limpeza de reservatórios de óleos

Segundo Nitschke e Pastore (2002) resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes, que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo e água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão. Segundo Bognolo (1999), os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemático.

Conforme Banat (1991), a utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promoveu a limpeza e recuperação de 90 % dos hidrocarbonetos presentes no resíduo.

2.5.4.3. Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)

Segundo Banat (1995), a MEOR consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas.

O mecanismo de MEOR *in situ* deve-se provavelmente a múltiplos efeitos dos microrganismos no ambiente e no óleo. Estes efeitos incluem: formação de gás e aumento da pressão; produção de ácido e degradação da matriz calcárea; redução na viscosidade do óleo e da tensão interfacial pela produção de biossurfactantes; produção de solventes; degradação de macromoléculas do óleo, resultando em diminuição da viscosidade; bloqueio seletivo da biomassa nas zonas de alta permeabilidade (Jack, 1988; Khire e Khan, 1994).

A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subsequente propagação *in*

situ; ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos selvagens produtores de surfactantes, ou ainda, a produção de biossurfactantes em reatores e posterior injeção no reservatório (Banat *et al.*, 2000).

2.5.4.4. Aplicações terapêuticas

Vários biossurfactantes apresentam atividade antibiótica, demonstrada, principalmente pelos biossurfactantes da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos.

A surfactina possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (Peypoux *et al.*, 1999). Thimon *et al.* (1995) descreveram a iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, que demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras.

2.5.4.5. Outras aplicações

Os biossurfactantes apresentam diversas outras aplicações na agricultura, mineração, na indústria de produtos de higiene e cosméticos. Alguns soforolipídeos (Figura 2.6) são utilizados comercialmente como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem (Desai e Banat, 1997). Segundo Nitschke e Pastore (2002), a KAO Co. LTDA desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídeos, que são esterilizados posteriormente, resultando em um produto que pode ser aplicado em batons e como hidratante em cremes corporais e de cabelos.

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes para o processamento de matérias-primas (Banat, 2000). Também são aplicados na indústria de papel, têxtil e cerâmica.

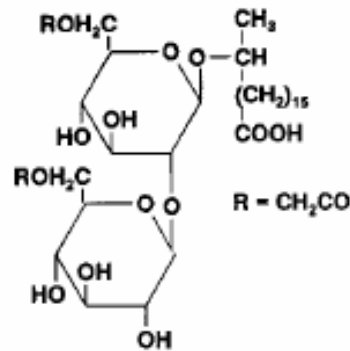


Figura 2.6: Soforolípídeos de *Torulopsi bombicola* (Desai e Banat, 1997).

2.6. Ramnolípídeos

Dentre os biossurfactantes, destacam-se os ramnolípídeos, formados por uma ou duas moléculas de ramnose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico, (Figura 2.7) (Desai e Banat, 1997). Os ramnolípídeos foram isolados pela primeira vez por Berstrom em 1946 de *Pseudomonas pyocyanea* e posteriormente, Jarvis e Jonhson em 1949, mostraram uma ligação glicosídica de β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato com duas moléculas de ramnose em cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* com 3 % (v/v) de glicerol.

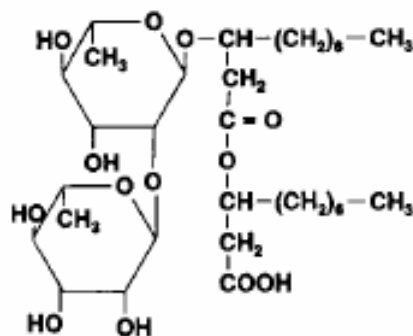


Figura 2.7: Estrutura química do ramnolípídeos de *P. aeruginosa* (Nitschke e Pastore, 2002).

Os ramnolípídeos produzidos por *Pseudomonas* sp. têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial contra n-hexadecano para 1 dina.cm^{-1} e a tensão superficial da água para 25 a 30 dina.cm^{-1} , usando concentrações entre 10 e 200 mg.L^{-1} (Lang e Wagner, 1987). Além de

reduzirem a tensão superficial, estabilizam emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (Banat *et al.*, 2000).

Lang e Wullbrandt (1999) estimam que ramnolipídeos custam em torno de 5,00 a 20,00 dólares por quilo quando produzidos por fermentação, nas quantidades de 20 m³ (US \$20,00/Kg) e para 100 m³ (US \$5,00/Kg). Em contraste, alquil-poliglicosídeo, custa em torno de \$1-3/Kg.

Embora o potencial de produção seja determinado pela genética do microrganismo, outros fatores como as condições ambientais e a natureza do substrato também influenciam no nível de expressão (Rahman *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* pode utilizar substratos como alcanos, piruvato, glicerol, succinato, frutose, óleo de oliva, glicose e manitol para produzir ramnolipídeos (Mulligan *et al.*, 2001).

Segundo Santos (2004), os valores das propriedades tensoativas variam de acordo com a composição da mistura de ramnolipídeos. Enquanto um anel adicional de L-ramnose confere maior hidrofilicidade ao ramnolipídeo, carbonos adicionais à cadeia de ácido graxo ou um maior número de insaturações aumentam sua hidrofobicidade. Essas diferenças estruturais podem afetar a estabilidade deste biossurfactante na fase aquosa e sua capacidade de solubilização de compostos orgânicos (Mata-Sandoval *et al.*, 1999).

Além das propriedades surfactantes, os ramnolipídeos podem ser utilizados com agentes de quelação e remoção de metais pesados, como cádmio e zinco (Kitamoto *et al.*, 2002; Lang e Wullbrandt, 1999; Sandri *et al.*, 2000). Ramnolipídeos podem ser utilizados como fonte de L-ramnose e (R)-3-hidroxidecanoato através de sua hidrólise. A L-ramnose é usada comercialmente na produção de compostos flavorizantes de alta qualidade e o (R)-3-hidroxidecanoato pode ser usado como bloco de construção quiral (Lang e Wullbrandt, 1999).

Várias atividades biológicas foram encontradas para os ramnolipídeos, incluindo propriedades antiviral (Desai e Banat, 1997), bactericida e fungicida (Kitamoto *et al.*, 2002). Segundo Maier e Soberon-Chávez (2000), também são usando como aditivos em cosméticos no Japão (Iwata Co. Japan). Alguns trabalhos estudam a biodegradação de hidrocarbonetos, como por exemplo, o hexadecano por ramnolipídeos (Desai e Banat, 1997).

2.7. Surfactina

A bactéria *Bacillus sp.* produz biossurfactantes da classe dos lipopeptídeos (Nitschke e Pastore, 2002). *Bacillus subtilis* produz a surfactina, a qual é considerada um dos mais potentes biossurfactantes conhecidos (Nitschke, 2004). Segundo Cooper e Zajic (1980), a CMC da surfactina em água é de 25 mg.L⁻¹ e a tensão superficial atinge níveis de 25 dina.cm⁻¹ e a tensão interfacial contra hexadecano é 1 dina.cm⁻¹. Além da surfactina, *B. subtilis* produzem outros lipopeptídeos cíclicos como, iturina A e fengicida (Ohno *et al.*, 1995).

Arima *et al.* (1968) descreveu as propriedades físico-químicas da surfactina. A surfactina é um lipopeptídeo aniônico de massa molecular igual a 1050±100 Da. Apresenta-se na forma de cristais de agulha de coloração branca, com ponto de fusão entre 137-140°C. É solúvel em água alcalina, acetona, metanol, etanol, benzeno, clorofórmio e ácido acético glacial, sendo insolúvel em água e ácidos minerais. É estável na faixa de pH de 7 a 9 a 120°C por 30 minutos, sendo precipitada em soluções alcalinas com 50 % de saturação com sulfato de amônio ou metais divalentes.

A Figura 2.8 apresenta a estrutura da surfactina. Em termos estruturais, ela consiste de um heptapeptídeo unido por ligação lactônica a um ácido graxo β-hidróxi contendo de 13 a 15 carbonos. Esta molécula simples se apresenta como um promissor agente antitumoral, antiviral e anti-micoplasma (Peypoux *et al.*, 1999). Dentre os efeitos biológicos da surfactina, também se destaca a atividade antimicrobiana (Nitschke, 2004). A ação da surfactina parece estar relacionada a alterações na integridade das membranas celulares (Nitschke, 2004).

Mais recentemente, outras aplicações têm sido demonstradas como, emulsificação, agente espessante e estabilizador de espuma (Desai e Banat, 1997).

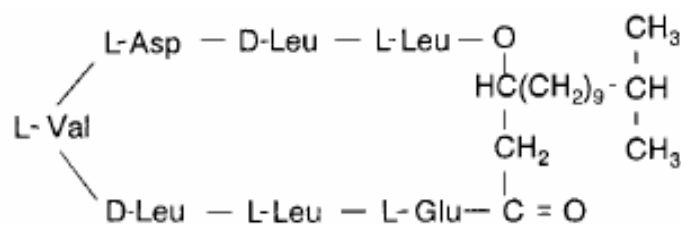


Figura 2.8: Estrutura química da surfactina (Nitschke e Pastore, 2002).

Em contraste com a maioria dos metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*, a biossíntese da surfactina ocorre durante a fase de crescimento e também na fase pós-exponencial (Peypoux *et al.*, 1999).

2.8. Características Morfológicas e Fisiológicas das bactérias utilizadas neste trabalho

2.8.1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

Segundo Todar (2004), *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa (Figura 2.9), aeróbica que pertence à família *Pseudomonadaceae*. Estas bactérias são habitantes comuns no solo e na água. Ocorrem regularmente nas superfícies das plantas e ocasionalmente nos animais. Um dos produtos de seu metabolismo são moléculas de biosurfactantes.



Figura 2.9: Foto do teste de gram da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (Todar, 2005).

2.8.2. *Bacillus subtilis*

A bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* utilizada neste trabalho foi isolada 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 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 biossurfactantes. A referida linhagem foi identificada molecularmente por Gomes (2007) como *B. subtilis*, passando então a ser denominada por *B. subtilis* LAMI007.

2.9. Produção de Biossurfactantes: Condições e Meio de Cultivo

Para planejar a formulação de um meio de cultivo para a obtenção de biomassa ou metabólitos secundários sintetizado por um microrganismo selecionado, vários elementos que compõem ou caracterizam esse meio de cultivo, devem ser considerados. Entre os elementos que demandam estudo com o objetivo de formular um meio de cultivo estão: fonte de carbono (que apresenta uma grande variedade, incluindo hidrocarbonetos, carboidratos e óleos vegetais); fonte de nitrogênio; sais minerais e elementos traços (Santos, 2004).

Diversas fontes de carbono são apontadas na literatura para a produção de biossurfactantes por diferentes cepas de *P. aeruginosa* (Daniels *et al.*, 1988; Robert *et al.*, 1989; Mercade e Manresa, 1994; Babu *et al.*, 1996; Sim *et al.*, 1997 e Benincasa *et al.*, 2001). Essas fontes de carbono podem ser renováveis como as provenientes da agroindústria, do processamento de óleos vegetais, da indústria de álcool, de resíduos industriais ou, não-renováveis, como as fontes de carbono derivadas do refino de petróleo. A Tabela 2.6 apresenta dados de estudos de produção de ramnolipídeos por *P.aeruginosa* registrados na literatura científica.

O tipo, as propriedades e a quantidade de biossurfactante produzido por uma cultura microbiana dependem não somente do microrganismo utilizado, mas também do substrato disponível. A modificação do substrato frequentemente altera a estrutura do produto e, conseqüentemente, suas propriedades (Nitschke, 2004).

Tabela 2.6: Estudos de produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*.

Cepa	Fonte de Carbono (g.L ⁻¹)	Fonte de Nitrogênio (g.L ⁻¹)	RL (g.L ⁻¹)	Tempo de Cultivo (h)	Referência
<i>P. aeruginosa</i>	Glicerol (30)	Peptona (40)	2,5	96	Jarvis e Johson, 1949
<i>P. aeruginosa</i> KY 4025	n-parafina (90)	Extrato de levedura (10) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (4)	8,5	144	Suzuki e Itoh, 1972
<i>P. sp.</i>	n-parafina (50)	-	14,0	120	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1976
<i>P. aeruginosa</i> UI 29791	Óleo de milho (75)	-	46,0	192	Daniels <i>et al.</i> , 1988
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Óleo de oliva (20)	NaNO ₃	7,65	72	Robert <i>et al.</i> , 1989
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Óleo de oliva (20)	-	9,0	110	Manresa <i>et al.</i> , 1991
<i>P. sp.</i> JAMM	Óleo de oliva ^a (24)	-	1,4	150	Mercade e Manresa, 1994
<i>P. aeruginosa</i> DSM 7108	Óleo de soja (125)	-	78,0	167	Wullbrandt <i>et al.</i> , 1994
<i>P. aeruginosa</i> GS3	Melaço	CLS (7 % v/v)	0,24	96	Patel e Desai, 1997
<i>P. aeruginosa</i> BS2	Soro de leite (20)	-	1,78	44	Babu <i>et al.</i> , 1996
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	Etanol (55)	Extrato de levedura (5) + farelo de soja (5)	32,0	168	Matsufuji <i>et al.</i> , 1997
<i>P. aeruginosa</i> UW-1	Óleo de Canola (60)	NaNO ₃ (1,5)	24,3	216	Sim <i>et al.</i> , 1997
<i>P. aeruginosa</i> 47T2 NCIB	Óleo de fritura ^c (20)	NaNO ₃ (5,0)	2,7 ^d	80	Haba <i>et al.</i> , 2000
<i>P. aeruginosa</i> PA1	Glicerol (10)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,0)	1,7 ^d	240	Santa Anna <i>et al.</i> , 2001
<i>P. aeruginosa</i> LBI	“soapstock” ^a (25)	NaNO ₃ (6)	15,9	54	Benincasa <i>et al.</i> , 2002
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	Suco de Caju	Peptona	TS (29 dina.cm ⁻¹)	24	Rocha <i>et al.</i> , 2006

^a Rejeito de fabrica de óleo; ^b Rejeito de destilaria; ^c Óleo residual de fritura; ^d Expresso em L-Ramnose; TS: Tensão Superficial

Dependendo do microrganismo utilizado, diversas são as fontes de nitrogênio que podem ser utilizadas na formulação de meio de cultivos para a produção de biossurfactante,

incluindo desde fontes orgânicas complexas, como: milhocinas, peptona, farinha de peixe, uréia e autolisados de leveduras, até fontes inorgânicas como: nitrato de amônio, sulfato de amônio e outros (Mulligan e Gibbs, 1993). Em relação a fontes de nitrogênio, *P. aeruginosa* é capaz de utilizar tanto fontes orgânicas e complexas, como sais inorgânicos.

A fonte de nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas estruturais e enzimas e, portanto, fundamental para o crescimento celular e manutenção da maquinaria enzimática. Em contraste, Guerra-Santos *et al.* (1986) reportaram uma máxima produção de ramnolipídeos após limitação de nitrogênio, usando uma relação carbono/nitrogênio (C/N) entre 16:1 a 18:1 e não ocorreu à produção de biossurfactante sem limitação de nitrogênio (relação C/N de 11:1), tal fato também foi observado por Lang e Wullbrandt (1999).

Estudando a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em meio contendo glicose, como única fonte de carbono, Guerra-Santos *et al.* (1984) avaliaram duas fontes de nitrogênio, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo que NaNO_3 promoveu produção levemente maior que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Outros autores (Roubin *et al.*, 1989) relataram que o nitrato de amônio foi superior a cloreto de amônio e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio para a produção de surfactina. No estudo realizado por Davis *et al.* (1999), eles demonstraram um link entre o aumento na produção de surfactina e o crescimento limitado de nitrato, usando um meio definido com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.

Com relação aos micros nutrientes, a adição de ferro e manganês aumentou o rendimento na produção de surfactina por *B. subtilis*. Wei *et al.* (2004) relataram um aumento de dez vezes na produção de surfactina ao utilizar uma concentração de ferro de 4 mM, comparada a produção com o meio sem a suplementação de ferro. A produtividade de surfactina por *B. subtilis* foi incrementada de $0,33 \text{ g.L}^{-1}$ para $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ com a adição de $0,01 \text{ mM}$ de Mn^{+2} utilizando um meio definido de glicose (Wei e Chu, 2002).

Segundo Peypoux *et al.* (1999) a estrutura da surfactina é influenciada pela concentração de aminoácidos no meio. A adição de ácido glutâmico e asparagina aumentaram a produção de liquenesina-A por *B. licheniformis* BAS50 (Yakimov *et al.*, 1995).

A concentração de fosfato pode também influenciar a produção de biossurfactante (Mulligan *et al.*, 1989a). O fosfato inorgânico também é importante pela sua capacidade

tamponante. Guerra-Santos *et al.* (1986), citou que a relação carbono/fósforo (C/P) é importante na produção de ramnolípídeo por *P. aeruginosa*.

Reis *et al.* (2004) investigou a produção de biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 6633 usando açúcar comercial, caldo de cana-de-açúcar, melaço da cana, glicerol, resíduo do processamento de álcool da cana-de-açúcar, manitol e óleo de soja. O açúcar comercial apresentou maior redução da tensão superficial (28,7 dina.cm⁻¹, com uma concentração micelar crítica relativa (CMC⁻¹) de 78,6 mg.L⁻¹), com 10 g.L⁻¹ de substrato em 48 horas de cultivo.

Adição de suporte sólidos porosos (por exemplo, carvão ativado ou argila expandida) na fermentação incrementou significativamente a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332. Em meio de cultura, contendo 25 g.L⁻¹ de carvão ativado, obteve-se um alto rendimento de surfactina (3600 mg.L⁻¹), aproximadamente 36 vezes maior do que obtido no meio sem suporte sólido (Yeh, *et al.*, 2005).

Além da questão nutricional, alguns critérios físico-químicos devem ser obedecidos, sendo estes compatíveis com a natureza do microrganismo e do metabólito que se deseja produzir. Assim, parâmetros como pH, temperatura, força iônica, oxigênio dissolvido e micronutrientes estão relacionados com a composição do meio de cultivo (Santos, 2004).

Parâmetros como pH e temperatura também são fundamentais para a produção de biossurfactantes. Variações nos valores de pH (entre 6,0 e 7,5) e de temperatura (entre 28 e 37°C) são descritos na literatura como parâmetros que podem variar de acordo com a cepa de *P. aeruginosa* utilizada para a síntese de ramnolípídeos (Desai e Banat, 1997; Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Guerra-Santos *et al.*, 1984; Santos, 2004). As condições de cultivo das cepas de *B. subtilis* geralmente incluem aerobiose e temperaturas na faixa de 30-37°C (Makkar e Cameotra, 1997).

No estudo realizado por Reis *et al.* (2004), a produção de biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 6633 aumentou em fermentações conduzidas a pH na faixa entre 7,0 e 8,0 utilizando matéria-prima de baixo custo. Os autores observaram ainda uma melhor atividade emulsificante do biossurfactante produzido nesta faixa de pH.

Makkar e Cameotra (1998) avaliaram a habilidade de *B. subtilis* crescer e produzir biossurfactante utilizando diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, piruvato de sódio, amido, acetato de sódio, pristano, hexadecano e dodecano) e nitrogênio (nitrato de amônio,

sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio e uréia) em condições termófilas (45°C). Os autores concluíram que a cepa cresceu e produziu biossurfactante nas fontes de carbono: glicose, sacarose, piruvato de sódio e amido, não apresentando crescimento ou produção de biossurfactante quando acetato de sódio e hidrocarbonetos foram utilizados como fonte de carbono, tanto em condições mesófilas (30°C) como termófilas (45°C). Nitrato de sódio e nitrato de potássio foram as fontes de nitrogênio que apresentaram melhores resultados para a produção de biossurfactante, fato observado através da diminuição da tensão superficial do meio de cultivo.

2.10. Produção de Biossurfactantes utilizando substratos não convencionais

A economia é o fator crucial para o desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico. O sucesso da produção de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de matérias-primas de baixo custo, uma vez que estas representam em torno de 10-30 % do custo total do processo (Makkar e Cameotra, 1998).

Uma das principais dificuldades na seleção de um resíduo como matéria-prima ou substrato alternativo é encontrar a composição adequada de nutrientes que permitem tanto o crescimento celular como o acúmulo do produto de interesse (Nitschke, 2004). Em geral, substratos agroindustriais contendo altos níveis de carboidratos servem como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (Makkar e Cameotra, 2002).

Atualmente, as alternativas de valorização de resíduos através do aproveitamento em diversas atividades têm sido muito incentivadas, já que podem contribuir para a redução da poluição ambiental bem como permitir a valorização econômica desses resíduos que, até tempos atrás, eram simplesmente descartados (Damasceno *et al.*, 1999).

Um exemplo real é o que vem ocorrendo com a manipueira, resíduo líquido gerado nas indústrias de processamento de mandioca. Apesar de altamente poluente, por sua elevada concentração de compostos orgânicos e tóxicos pela presença de cianeto resultante dos glicosídeos cianogênicos da mandioca, que sob a ação enzimática são hidrolisados a cianeto, pode ser considerado um resíduo rico em nutrientes, o que o torna passível de ser empregado como matéria-prima em outras atividades, como exemplo no desenvolvimento de microrganismos (Damasceno *et al.*, 1999).

Recentemente, demonstrou-se a produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* com atividade emulsificante, utilizando-se óleos vegetais típicos das regiões Norte e Nordeste do Brasil (Damasceno *et al.*, 1999).

Mercades *et al.* (1993) estudou o aproveitamento de resíduos do processamento do óleo de oliva como um novo substrato para produção de biossurfactante (ramnolípideo) por *Pseudomonas* sp.. O efluente do processamento de oliva é um maior poluente da indústria de agricultura nos países mediterrâneos, este contém substâncias tóxicas como os polifênóis e grandes substâncias de valor orgânico como açúcares (20-80 g.L⁻¹) e compostos nitrogenados (12-24 g.L⁻¹), ácidos orgânicos (5-15 g.L⁻¹) e óleo residual (0,3-5 g.L⁻¹) e tem sido aplicado para produzir proteínas e enzimas (Mercades *et al.*, 1993).

Makkar e Cameotra (1997) estudaram a produção em melão e Sheppard e Mulligan (1987) utilizaram turfa hidrolisada para a produção de ramnolípideo por diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Batata (composta por 80 % de água, 17 % de carboidratos, 2 % de proteínas, 0,1 % de gordura e 0,9 % de vitaminas, minerais inorgânicos e traços de metais) foi avaliada como fonte de carbono para a produção de surfactina por *B. subtilis* em frasco agitado por Fox e Bala (2000).

A produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* foi realizada, utilizando-se meio de cultura, tendo como base água do mar, óleo de milho como fonte de carbono, tamponado com fosfato de potássio (Vance-Harrop *et al.*, 1999). Os melhores resultados foram obtidos com o meio YSW-C1 (sulfato de amônia 0,1 g; uréia 0,1 g; fosfato de potássio 10 mM; óleo de milho 5,0 mL; 50 mL de água do mar e 50 mL de água destilada pH 5,3). Zhou e Kosaric (1995), utilizaram óleo de canola e lactose presente no soro do processamento de queijo, como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes por *Candida apícola*. Os autores obtiveram altos rendimentos, além de uma redução na tensão superficial de 72 para 33 dina.cm⁻¹ e da tensão interfacial de 40 para 1 dina.cm⁻¹. Shabtai (1989), estudou a produção de exopolisacarídeos por *Acinetobacter* por fermentação em batelada alimentada usando “soapstock” (SSO) como fonte de carbono.

Robert *et al.* (1989) comparando o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de ramnolípidos por *P. aeruginosa*, verificaram que os melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se óleo de oliva, cuja produção final foi de 7,65 g.L⁻¹, com coeficiente de

produção de 38,2 % do substrato adicionado. Observaram também, que o nitrato foi a fonte de nitrogênio mais adequada para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* 44T1, cultivada em óleo de oliva, sendo que a produção começou após 30 horas de crescimento, quando a cultura atingiu a limitação de nitrogênio e continuou a aumentar até 58 horas de fermentação.

Óleos nativos brasileiros como: óleo de Buriti (*Mauritia flexuosa*), Cupuaçu (*Theobroma grandiflora*), Maracujá (*Passiflora alata*), Andiroba (*Carapa guianensis*), Noz Brasileira (*Bertholletia excelsa*) e Babaçu (*Orbignya* ssp.) foram avaliados como fonte de carbono para produzir ramnolipídeos por *P. aeruginosa* LB1 estudado por Costa *et al.* (2005). A maior concentração de ramnolípídeo foi obtida nos ensaios que utilizou os óleos de Noz Brasileira (9,9 g.L⁻¹) e Maracujá (9,2 g.L⁻¹), obtendo tensão superficial de 30,6 e 29,8 dina.cm⁻¹, respectivamente. A maior concentração de biomassa, no entanto, foi obtida quando se utilizou Andiroba (1,53 g.L⁻¹).

A Tabela 2.7 apresenta um resumo de estudos feitos sobre produção de biossurfactantes utilizando substratos não convencionais. Dados da produção de ramnolípídeos encontram-se na Tabela 2.6, citada anteriormente.

Tabela 2.7: Estudos feitos com matérias-primas não convencionais para a produção de biossurfactantes.

Microrganismo	Substrato Alternativo	Observação	Referência
<i>Candida lipolytica</i>	Óleos vegetais típicos das regiões Norte e Nordeste do Brasil.	Produção de biopolímeros com atividade emulsificante	Damasceno <i>et al.</i> , 1999
<i>Candida lipolytica</i>	Óleo de milho + água do mar	-	Vance-Harrop <i>et al.</i> , 1999
<i>Tsukamurella spec DSM 44370</i>	Óleos vegetais domésticos	-	Vollbrecht <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus sp</i>	Água residual de turfa	-	Mulligan e Cooper, 1985
<i>Bacillus subtilis</i>	Resíduos ricos em goma das indústrias de processamento de batata	-	Fox e Bala, 2000
<i>Bacillus subtilis</i>	Manipueira	Apresentou atividade antimicrobiana e antiviral.	Nitschke M., 2004
<i>Bacillus subtilis</i>	Material de baixo custo, como: manitol, óleo de soja e açúcar comercial.	-	Reis <i>et al.</i> , 2004

2.11. Suco de Caju como Matéria-Prima Não-Convencional

O cajueiro pertencente à família *Anacardiaceae*, *Dicotyledonea* e ao gênero *Anacardium* (Figura 2.10). O litoral nordestino apresenta as melhores condições ecológicas para o seu cultivo. O caju é composto da castanha (fruto) e do pedúnculo (pseudofruto).

O cajueiro é encontrado em grande parte do mundo ocidental, tendo sua área de ocorrência compreendida entre as latitudes de 30° Norte e 31° Sul, sendo cultivado atualmente em 27 países. Os principais produtores de castanha são Vietenan, Índia, Nigéria, Brasil,

Tanzânia e Indonésia, com 36,60, 14,64, 12,81, 8,86 e 5,74 %, respectivamente, da produção mundial (Pereira, 2005).



Figura 2.10: Detalhe das folhas e flores do Cajueiro da família *Anacardiaceae* e do gênero *Anacardium*, espécie *Anacardium occidentale* L.

A área ocupada com cajueiro, no Brasil, corresponde a aproximadamente 700.000 hectares (Embrapa, 2005), sendo que a região Nordeste responde com mais de 99 % da área colhida e da produção nacional. Os estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte possuem cerca de 90 % da área cultivada no país. Nestes locais, a cajucultura destaca-se, no contexto sócio e econômico, pelo valor nutritivo e comercial dos seus produtos, que garantem uma expressiva renda (Souza *et al.*, 2002).

O caju é um fruto de especial interesse botânico, sendo conhecido pela sua castanha de alta qualidade. O fruto do cajueiro, a castanha, é definido como um aquênio reniforme pendente do pedúnculo floral, hipertrofiado, carnoso e suculento. Segundo Faria (1994), a castanha é constituída basicamente de três partes: a casca (65,4 %), a película (2,5 %) e a amêndoa (32,1 %).

A média da massa do pedúnculo situa-se na faixa de 70 a 90 gramas, com comprimento em torno de 6 a 10 cm. A aceitabilidade e o consumo de caju *in natura* estão relacionados a dois aspectos principais: adstringência e coloração da casca (Faria, 1994).

Conforme Pereira *et al.* (2005) várias pesquisas foram desenvolvidas para a obtenção de genótipos de cajueiro que permitissem não só o aumento de produtividade, como também a melhoria da qualidade da castanha para a indústria e o aproveitamento do pedúnculo. Desse modo, a recuperação no campo vem sendo feita com o uso de clones, cultivados dentro das normas técnicas de produção (Pereira *et al.*, 2005).

A amêndoa da castanha de caju apresenta grande valor nutritivo. É considerada fonte de proteína de alta qualidade, rica em ácidos graxos poli-insaturados e altamente energéticos, rica em gorduras e carboidratos, apresentando ainda elevados teores de cálcio, ferro e fósforo (Campos *et al.*, 2002). O consumo no mercado interno e externo da castanha de caju em 2004 foi de aproximadamente 232.000 toneladas, (Embrapa, 2005).

A porção comestível, que representa 90 % do caju, é o pedúnculo. O valor nutritivo do pedúnculo de caju revela-se sob a forma de vitaminas e sais minerais. O conteúdo de vitamina C do pedúnculo é superior ao da goiaba, mamão, limão e tomate que o coloca como um grande fornecedor desta vitamina (Mudambi e Rajagorpal, 1977). Além desta, destaca-se ainda a vitamina A e sais minerais como cálcio, ferro e fósforo (Ogunmyela, 1983). No entanto, apenas uma pequena parte do pedúnculo produzido é aproveitada industrialmente. Apenas uma pequena porcentagem, em torno de 6 a 12 %, é consumida ou processada industrialmente para produzir uma larga faixa de produtos como sucos, sorvetes, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados, aguardentes e doces. Os produtos processados industrialmente são basicamente consumidos pelo mercado local e não apresentam papel importante na economia regional (Morton e Dowling, 1987).

O pedúnculo também é importante, pois constitui proveitosa fonte alimentícia no Nordeste do Brasil, ou na forma *in natura*, ou processada (Moura *et al.*, 2001). Até recentemente, os pedúnculos eram vendidos exclusivamente em feiras locais, porém hoje alcançam supermercados em outras partes do país, localizadas a mais de 4.000 km do local de produção, podendo ser mantidos em boas condições por até quinze dias, devido ao desenvolvimento de técnicas adequadas de manuseio e conservação pós-colheita (Moura *et al.*, 2001). Nos países importadores de frutas, a falta de conhecimento do valor nutritivo do pedúnculo tem sido o principal motivo para seu baixo consumo (Pereira *et al.*, 2005).

No nordeste do Brasil, especialmente no estado do Ceará, a agroindústria do caju (Figura 2.11) contribui de forma relevante para a pauta das exportações nordestinas (amêndoa,

suco e líquido da castanha de caju (LCC)) e, sem dúvida, é o setor mais importante da economia regional. A cultura do caju no estado do Ceará é responsável pela geração de 30.000 empregos diretos e 100.000 empregos indiretos (Sindicato dos Produtores de Caju do estado do Ceará – SINCAJU). Associado ao caráter social e econômico do cajueiro, existe ainda a característica de tolerância à seca, credenciando-o como uma espécie capaz de gerar riquezas e ser importante para fixar o homem no campo.

A quantidade desperdiçada (92 a 94 %) apresenta elevado potencial, pois é matéria-prima rica em carboidratos (açúcar e amido), fibras, vitaminas e sais minerais. Pode-se considerar o pedúnculo de caju como um substrato nobre e de baixo custo (R\$ 1,00/Kg) para diversas aplicações como, por exemplo, a produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* (Oliveira, 2004) e de biossurfactantes por *Acinetobacter calcoaceticus* (Rocha *et al.*, 2006).



Figura 2.11: Caju e Suco de Caju (SINDICAJU).

Assunção e Mercadante (2003) avaliaram a composição de carotenóides e ácido ascórbico em produtos comerciais de caju *Anacardium occidentale L.* Estes se apresentaram como excelente fonte de vitamina C, no entanto, não são boas fontes de carotenóides para a dieta humana.

Ezeronye (2004) estudou a utilização do suco de caju como substrato para a fabricação de vinho, concluindo que este apresentou como um bom substrato para a fermentação em

escala comercial. Osho (2005) avaliou o suco de caju como suporte para o crescimento de leveduras e sugeriu como reserva alimentar e produção de vinho. Outro autor (Akinwale, 2000) estudou o uso do suco de caju para melhorar a qualidade nutricional de algumas frutas tropicais, devido este apresentar alta concentração de vitamina C.

2.12. Extração e Purificação de Biossurfactantes

A produção de biossurfactantes apresenta alto custo devido ao uso de substrato caro e a métodos de recuperação onerosos e que não possibilitam obter altos rendimentos. O desenvolvimento de métodos simplificados para a recuperação do produto é uma estratégia explorada para reduzir os custos com a produção, salientando ainda o uso de matéria-prima de baixo custo.

Desai e Banat (1997) relatam que a recuperação de biossurfactantes depende de sua carga iônica, solubilidade e localização (se é produzido intracelular ou extracelular). Compostos intracelulares requerem maior custo de recuperação, devido necessitar primeiramente de uma etapa que possibilite lise das células (Mulligan e Gibbs, 1993). Para biossurfactantes produzidos extracelularmente, a técnica mais utilizada para a recuperação é a extração com solventes orgânicos (Desai e Banat, 1997).

Segundo Mulligan e Gibbs (1993), quando hidrocarbonetos são usados como fontes de carbono, surge a dificuldade de separar o surfactante sem deixar traços de substrato no produto final. Este aspecto é muito importante se o produto for aplicado na indústria de alimentos ou farmacêuticas.

Os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* podem ser separados por extração ácida, seguida de extração com metanol/clorofórmio (Mata-Sandoval, *et al.*, 1999). O método de HPLC foi desenvolvido para quantificar ramnolipídeos (Mata-Sandoval *et al.*, 1999). Com relação aos biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* e *Candida Tropicalis* sua extração também pode ser realizada por precipitação com acetona (Mulligan e Gibbs, 1993).

A Tabela 2.8 apresenta o processo *downstream* para a recuperação de biossurfactantes sendo este processo dependente da classe de biossurfactante obtido.

Tabela 2.8: Processos *downstream* para a recuperação de biossurfactantes.

Biossurfactante recuperado	Processo
Emulsan	Precipitação com sulfato de amônia
Glicolípido	Precipitação com acetona
Surfactina	Precipitação Ácida
Ramnolípídeos, Trehaloselípídeos, Soforolípídeos e Liposan	Extração com solvente
Glicolípídeos	Cristalização
Ramnolípídeos, Glicolípídeos e Lipopeptídeos	Adsorção
Glicolípídeos	Ultrafiltração

Fonte: Desai e Banat, 1997.

A surfactina e outros biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* podem ser extraídos por precipitação ácida, ajustando o pH do meio para o ponto isoelétrico do composto desejado (o da surfactina está em torno de pH = 2,0). A surfactina produzida por *B. subtilis* pode ser removida do meio através de coleta de espuma sendo posteriormente precipitada e extraída com solventes (Cooper *et al.*, 1981).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Matéria-Prima

Neste trabalho avaliou-se a produção de biossurfactantes utilizando suco de caju, integral ou clarificado, como meio de cultivo. O suco de caju integral (CAJN) foi preparado a partir de cajus (*Anacardium occidentale* L.) coletados na Horta da Universidade Federal do Ceará. O suco de caju clarificado (CAJC) foi gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Gustavo Adolfo Saavedra da Embrapa Agroindústria Tropical.

3.1.2 Microrganismos

Neste trabalho, três microrganismos foram avaliados: *Bacillus subtilis* LAMI007 (Figura 3.1), isolada do tanque de cloração da Estação de Tratamento de Esgoto do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (ETE-PICI); *Pseudomonas aeruginosa* LAMI (Figura 3.2), isolada a partir do efluente contaminado com óleo de um navio petroleiro, na costa cearense e uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (Figura 3.3), gentilmente cedida pela Pesquisadora Dra. Fátima Borges da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. As bactérias *B. subtilis* LAMI007 e *P. aeruginosa* foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Vânia Maria Melo do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Ceará, sendo estas linhagens pertencentes à coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMI) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.



Figura 3.1: Colônias da bactéria *B. subtilis* LAMI007 em meio APGE.

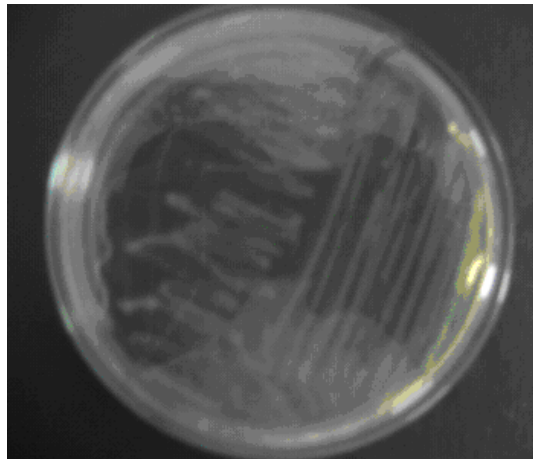


Figura 3.2: *P. aeruginosa* LAMI isolada de efluente contaminado com óleo de um navio petroleiro na costa cearense cultivada em meio Ágar Nutritivo.



Figura 3.3: *P. aeruginosa* ATCC 10145 cultivada em meio Ágar Nutritivo.

3.1.3. Meios de Cultura

3.1.3.1. Meio de manutenção: Para manutenção da bactéria *Bacillus subtilis* LAMI007, utilizou-se o meio APGE (contendo: peptona 5,0 g.L⁻¹, glicose 5,0 g.L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹ e Ágar 15,0 g.L⁻¹). A bactéria *P. aeruginosa* foi mantida em ágar nutritivo (extrato de levedura 3 g.L⁻¹, peptona 5 g.L⁻¹ e ágar 15 g.L⁻¹, marca Biolife - Itália). Todas as culturas foram mantidas em meio de camada alta, recobertas com óleo mineral, sob refrigeração a 4°C e repicadas a cada 60 dias.

3.1.3.2. Meio de propagação do inoculo: O meio de cultura utilizado para a produção do inoculo da *P. aeruginosa* foi o caldo nutritivo (composto de peptona 5 g.L⁻¹ e extrato de carne 3 g.L⁻¹, marca Biolife - Itália). Para o *B. subtilis* LAMI007, utilizou-se meio mineral (Tabela 3.1), contendo como fonte de carbono, açúcares provenientes do suco de caju clarificado (10 g.L⁻¹) e 0,1 % de solução de micro nutrientes (Tabela 3.2).

Tabela 3.1: Composição do meio mineral (MM).

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	7,2
KH ₂ PO ₄	3,0
NaCl	27,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6

Fonte: Morán *et al.*, 2000.

Tabela 3.2: Composição da solução de micro nutrientes.

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

Fonte: Morán *et al.*, 2000.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação e caracterização da Matéria-Prima

3.2.1.1. Preparação do Suco de Caju Integral

Após a coleta, o caju foi conduzido ao Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, onde foi processado. Primeiramente, retirou-se a castanha e o pseudofruto (pedúnculo) foi lavado com água. Após a lavagem, o suco de caju foi obtido por prensagem do pseudofruto. Com a finalidade de retirar o bagaço e outras partículas sólidas, o suco de caju foi centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos e filtrado em papel de filtro com diâmetro de poros de 25 μm . Para armazenagem, o suco foi distribuído em garrafas plásticas e mantido a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, sem adição de conservantes.

3.2.1.2 Caracterização do Suco de Caju (Integral e Clarificado)

O suco de caju (integral e clarificado) foi caracterizado quanto à composição de minerais, nitrogênio, carbono e aminoácidos. O pH do suco foi medido utilizando um medidor de pH (Marca Tecnal, modelo Tec-3MP). A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Baethgen e Alley (1989), mais conhecido como método de Kjeldahl, e proteínas solúveis pelo método de Bradford (1976). A composição de aminoácidos foi analisada no Laboratório de Análises Químicas e Bioquímicas Clementino Fraga, por cromatografia de líquida de alta eficiência. A concentração de açúcares redutores totais foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), segundo Lima Lobato *et al.* (2002). A concentração de glicose e frutose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando cromatógrafo Waters (2414) acoplado a detector de índice de refração (célula a 40°C), coluna Shodex SC 1011 (8,0 mmID x 30 mmL) e fase móvel H_2O MiliQ com vazão de $0,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os açúcares presentes no suco foram determinados através de comparação com os tempos de retenção de soluções padrões de glicose e frutose. Os minerais Fe, Ca, Mg, Mn, Zn e Cu foram quantificados por espectrometria de absorção

atômica em um equipamento Perkin-Elmer (modelo A-Analyst 300). Potássio e sódio foram determinados por fotometria de chama em um equipamento DIGIMED (modelo DM-61).

3.2.2. Esterilização dos Meios de Cultura

Todos os meios sintéticos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Tanto o suco de caju natural (CAJN) quanto o suco de caju clarificado (CAJC) foram esterilizados por filtração em membrana (éster de celulose - Millipore) estéril com diâmetro de poros de 0,45 µm.

3.2.3. Propagação do inóculo

3.2.3.1. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

O inóculo de *P. aeruginosa* ATCC 10145 foi preparado inserindo-se 3 alças do *slant* contendo o microrganismo em 50 mL de caldo nutritivo. A seguir, incubou-se a 150 rpm e 30°C, durante 24 h, em agitador rotatório (*Shaker* Tecnal TE-480). Após este tempo, diluiu-se o inóculo com caldo nutritivo até que se obtivesse uma densidade ótica de 0,5, medida a 600 nm, em espectrofotômetro (Genesys, série 20). Posteriormente, retiraram-se alíquotas de 6 mL (2 % v/v), que foram utilizadas para inocular em 300 mL no meio de cultivo utilizado na produção do biossurfactante.

3.2.4.3. *Bacillus subtilis* LAMI007

Para a preparação do inóculo, *B. subtilis* LAMI007 foi repicado em placas contendo ágar APGE e a seguir incubado a 30°C por 24 horas. Após este período, três alçadas da cultura na fase exponencial de crescimento foram transferidas para frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de propagação do inóculo. Posteriormente, os frascos foram incubados em agitador rotatório (*Shaker* Tecnal TE-480) a 180 rpm, 30°C por 24 h. A densidade ótica do inóculo foi medida em

espectrofotômetro (Genesys, série 20) a 600 nm, utilizando como branco o meio mineral estéril. Visando a padronização do número de células iniciais em cada experimento, ajustou-se a densidade ótica entre uma faixa de 0,10 – 0,20 através de diluições com o meio de cultivo.

3.2.4. Ensaios preliminares de crescimento e produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI007 em suco de caju integral (CAJN)

Para se avaliar o crescimento de *B. subtilis* LAMI007 em suco de caju, foram conduzidos dois ensaios. No primeiro ensaio, diluiu-se o suco de caju na proporção de 1:10, nomeado como meio CAJN (10 %), e colocou-se 10 mL de suco em dois tubos de ensaio, que foram esterilizados a 110°C por 15 minutos, para evitar a caramelização dos açúcares. Em seguida, inoculou-se a bactéria nos dois tubos, incubou a 30°C por 48 h e verificou se houve crescimento do microrganismo. O segundo ensaio foi realizado de forma similar ao primeiro, porém, antes da esterilização, fez-se um ajuste do pH do suco diluído para 7,0 com NaOH 1M.

Posteriormente, avaliou-se a influência da concentração de glicose (10, 20 e 50 % v/v), proveniente do suco de caju integral, na produção de surfactina. Também se verificou a suplementação do meio CAJN (10 %) com diferentes fontes de nitrogênio - peptona e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - na concentração de 5 g.L⁻¹. Finalmente, avaliou-se a influência da suplementação do meio com micro nutrientes, sulfato ferroso (6,0 mg.L⁻¹) e sulfato de manganês (0,8 mg.L⁻¹), utilizando CAJN (10 %) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio.

3.2.5. Produção de Biossurfactantes em mesa agitadora

3.2.5.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

Para a produção de biossurfactantes utilizando *P. aeruginosa* ATCC 10145, suco de caju natural (CAJN) foi diluído com água, na proporção de 1:10, e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M. Posteriormente, esterilizou-se o meio por filtração utilizando

membrana com poro de diâmetro de 0,45 μm . Estudou-se o efeito da suplementação do suco com diferentes fontes de nitrogênio (peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou NaNO_3) e carbono (glicerol ou óleo de soja) na produção de biossurfactantes, também realizou-se com o meio sintético caldo nutritivo. A Tabela 3.3 resume os meios de cultivo utilizados para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* ATCC 10145. Em todos os ensaios com suplementação do suco, adicionaram-se 5 g.L^{-1} da fonte de nitrogênio ou 2 % (v/v) da fonte de carbono avaliada. A fermentação foi conduzida nas mesmas condições utilizadas para o preparo do inóculo. Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para medidas do pH e tensão superficial do meio de cultivo e determinação da concentração de açúcares, quando presentes. Antes de analisadas, as amostras eram primeiramente filtradas em membrana de diâmetro de 0,45 μm para a remoção de células.

Tabela 3.3: Meios de cultivo utilizados para o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e produção de biossurfactantes.

Meio de cultivo	Fonte de Nitrogênio	Fonte de Carbono
1	-	CAJN
2	-	CAJN + óleo de soja
3	Peptona	CAJN
4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	CAJN
5	NaNO_3	CAJN
6	Peptona	CAJN + glicerol
7	Peptona	CAJN + óleo de soja
8	Caldo Nutritivo	Caldo Nutritivo

3.2.5.2 *Bacillus subtilis* LAMI007

Para a produção de biossurfactantes utilizando *B. subtilis* LAMI007, adicionou-se 10 mL (10 % de inóculo) da cultura em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, formulado misturando meio mineral (Morán *et al.*, 2002), contendo, como fonte de carbono, açúcares provenientes do suco de caju clarificado (0,25 a 10 g.L^{-1}) ou açúcares PA (glicose, frutose ou sacarose, na concentração de 10

g.L⁻¹), e 0,1 % de solução de micro nutrientes. Avaliou-se ainda a influência da adição de extrato de levedura (5 g.L⁻¹) ao meio de cultivo na produção do biossurfactante.

Os cultivos foram conduzidos em agitador rotatório (*Shaker* Tecnal TE-480) a 180 rpm, 30°C por 120 horas e os experimentos foram conduzidos em duplicata. Alíquotas de 2 mL foram retiradas em tempos determinados para a determinação de biomassa, contagem de células viáveis e pH. As amostras foram centrifugadas a 10000g por 15 minutos e o sobrenadante livre de células, submetido às medidas de tensão superficial, índice de emulsificação, concentração de substrato (glicose e frutose) e concentração de surfactina.

3.2.6. Produção de Biossurfactantes em fermentador de bancada

Após otimização do meio de cultivo em mesa agitadora, realizaram-se ensaios para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LAMI, em fermentador de bancada de 5 L, sem aeração, com agitação de 200 rpm a temperatura de 30°C. Dois meios de cultivo foram avaliados: suplementado com peptona (5 g.L⁻¹) e CAJN (10 %) com NaNO₃ (5 g.L⁻¹). O reator operou com um volume de meio de cultivo de 3 litros, contendo uma concentração inicial de inóculo de 2 % (v/v). Uma breve descrição do fermentador encontra-se no Anexo A.

3.2.7. Extração e purificação do Biossurfactante

3.2.7.1. Biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145

Para a extração de ramnolipídeos, biossurfactante produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas*, separou-se as células por centrifugação a 10000g por 15 minutos do meio fermentado, em seguida ajustou-se o pH do meio de cultivo para 2,0 utilizando H₂SO₄ 6N. Posteriormente, foi realizada o processo de extração líquido-líquido, a qual se utilizou o CHCl₃/CH₃OH (2:1) e igual volume de meio livre de células. Agitou-se a mistura por 5 minutos e esperou a separação das fases, repetindo se três vezes a extração. As fases orgânicas foram misturadas e o produto foi concentrado utilizando

evaporação à vácuo em rota evaporador (Quimis). A seguir, o produto viscoso de cor amarela foi dissolvido em metanol e concentrado por evaporação do solvente a 45 °C (Costa *et al.*, 2005).

Outro método de extração foi utilizado para a recuperação do produto cristalino. O meio de cultura, livre de células, foi acidificado a pH 2,0 com HCl 3N, mantido a 4°C por 12 h e a seguir centrifugado a 10000g por 10 min. Os cristais obtidos foram analisados em microscópio Olympus na magnitude de 100x, colocados sobre uma lâmina de microscopia (Dubey and Juwarkar, 2001).

3.2.7.2. Biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI007

Para a extração da surfactina, biossurfactante produzido por microrganismos do gênero *Bacillus*, a cultura foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado utilizando membrana (éster de celulose - Millipore) de 0,45 µm e o pH do filtrado foi ajustado para 2.0 com HCl 3M. A solução resultante permaneceu em repouso por 12 h a 4°C para que ocorresse a precipitação da surfactina. Após este tempo, o extrato rico em surfactina foi centrifugado a 10000g por 15 minutos. Para purificação, a surfactina bruta foi dissolvida em água deionizada com pH 8,0 e extraída com o mesmo volume de diclorometano. Agitou-se por 5 minutos e esperou-se por 1 hora para que ocorresse separação das fases. Este procedimento foi repetido por três vezes. Todas as fases do solvente foram coletadas e evaporadas em evaporador rotatório. O produto obtido foi dissolvido com água deionizada pH 8,0.

3.2.8. Determinação do Efeito de NaCl, temperatura e pH na atividade do Biossurfactante

3.2.8.1. Estabilidade frente à força iônica

Após a purificação, diluiu-se o biossurfactante em água destilada contendo uma concentração conhecida de NaCl (entre 0,5 e 20 %, m/v) e a sua atividade foi avaliada através da medida de tensão superficial (Ilori *et al.*, 2005).

3.2.8.2. Estabilidade frente a pH

Para se determinar o efeito do pH na atividade emulsificante, variou-se o pH da solução, contendo o biossurfactante purificado e dissolvido em água destilada, entre 3,0 e 12,0, utilizando NaOH ou HCl 1M, para ajustar ao valor de pH desejado. A atividade foi avaliada através da medida de tensão superficial (Ilori *et al.*, 2005).

3.2.8.3. Estabilidade frente à temperatura

Para se avaliar o efeito de temperatura na atividade emulsificante, uma solução contendo o biossurfactante foi mantida a temperatura de 100°C por 15, 30, 60 e 75 minutos e a 121°C por 15 minutos. Após a solução atingir a temperatura ambiente, a tensão superficial foi determinada.

3.2.9. Métodos Analíticos

3.2.9.1. pH do meio de cultivo

O pH do meio de cultivo livre de células foi determinado utilizando-se um potenciômetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP, na temperatura ambiente (27°C).

3.2.9.2. Concentração de Biomassa

A concentração de biomassa foi acompanhada pela determinação da densidade óptica (DO) à 600 nm, em espectrofotômetro (Genesys, série 20). Esse método baseia-se na medida de turvação do meio em função da quantidade de células em suspensão, apresenta a vantagem de ser de rápida execução envolvendo equipamentos relativamente simples.

A concentração de biomassa também foi determinada por peso seco obtido por filtração utilizando membrana Millipore de 0,45 µm de diâmetro, previamente pesada. Neste procedimento, filtrou-se uma amostra de 5 mL do meio fermentado sobre vácuo,

depois lavou-se com três volume de água destilada (para remover componentes do meio), colocou-se em estufa a 60°C até que se obtivesse peso constante. Este método é uma modificação da metodologia de Reis *et al.* (2004).

3.2.9.3. Contagens de células viáveis

As amostras das culturas foram diluídas utilizando água peptonada (0,1 % m/v). Aliquotas dessas diluições foram plaqueadas em ágar nutritivo, em triplicata, através da técnica de *Spread Plate*. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h. Após esse período, as colônias foram contadas para enumeração da população celular em unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL⁻¹).

3.2.9.4. Determinação da concentração de Açúcares Totais

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), segundo Lima Lobato *et al.* (2002). A análise baseia-se na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. A presença do tartarato duplo de sódio e potássio destina-se a proteger o reagente da ação do oxigênio dissolvido.

O procedimento experimental para a determinação dos açúcares totais consistiu em preparar a amostra, adicionando-se 1 mL de ácido clorídrico 2N a 1 mL da amostra, que foi então aquecida a 80°C durante 5 min. Após este tempo, resfriou-se a amostra e acrescentou-se 3 mL de NaOH 1N. Posteriormente, adicionou-se 1,4 mL da amostra preparada a 1,4 mL de solução de DNS em tubos de Follin-Wu. Aqueceu-se por 5 minutos em Banho Maria (100°C). Após este tempo, resfriou-se os tubos em banho de gelo. A seguir, completou-se o volume do tubo com solução de tartarato duplo de sódio e potássio (15,01 g.L⁻¹). Fez-se então a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A calibração era feita previamente utilizando soluções padrões de glicose e frutose (entre 0,0 e 1,0 g.L⁻¹).

3.2.9.5. Determinação da concentração de Glicose, Frutose e Sacarose

A concentração de glicose, frutose e sacarose foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando cromatógrafo Waters (Modelo 2414) acoplado a detector de índice de refração (célula a 40°C), coluna Shodex SC 1011 (8,0 mmID x 30 mmL) e água H₂O (MiliQ) como fase móvel na vazão de 0,6 mL.min⁻¹ a 80°C. O volume de injeção das amostras foi de 5 µL.

A Figura 3.4 mostra o cromatograma típico do suco de caju clarificado quando analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. Observou-se picos característicos da glicose e frutose, com um tempo de retenção de 13,6 e 16,4 minutos, respectivamente, nas condições estudadas.

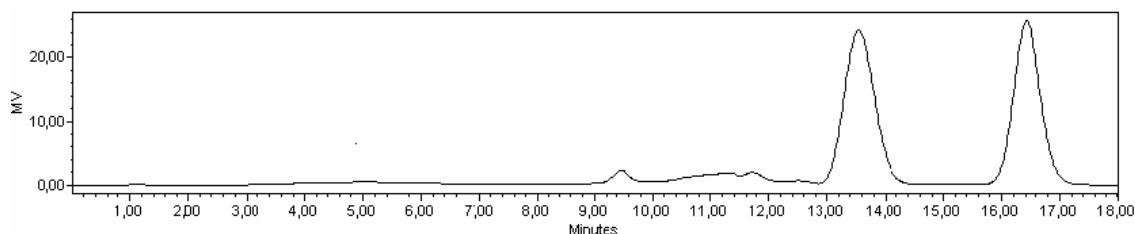


Figura 3.4: Cromatograma do suco de caju para determinação da concentração de açúcares. Coluna Shodex SC 1011 (8,0 mmID x 30 mmL) e água H₂O (MiliQ) como fase móvel na vazão de 0,6 mL.min⁻¹ a 80°C, injeções de 5 µL.

3.2.9.6. Determinação do biossurfactante

Dois métodos indiretos foram utilizados para acompanhar a produção do biossurfactante, são eles: determinação do índice de emulsificação e determinação da tensão superficial.

3.2.9.6.1. Determinação do Índice de Emulsificação

Este procedimento consistiu em colocar 2 mL do meio de cultura fermentado (livre de células) em tubo de ensaio, com fundo chato, adicionando o mesmo volume de

querosene e 0,2 mL de corante Rosa Bengala 0,1 %. Agitou-se em vortex por um minuto, em alta rotação (Cooper e Goldenberg, 1987; Makkar e Cameotra, 1997). Após 24 horas calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total (Equação 1). O teste do índice de emulsificação foi realizado em triplicata.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} * 100 \quad (1)$$

sendo H_{EL} a altura da região emulsificada e H_S a altura total da solução.

3.2.9.6.2. Determinação da tensão superficial

Como a presença do biossurfactante diminui a tensão superficial do meio, este parâmetro foi utilizado para acompanhar a sua produção (Lima Lobato *et al.*, 2002; Nitschke *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2001, Rocha *et al.*, 2006). As medidas de tensão superficial dos sobrenadantes obtidos após a produção dos biossurfactantes foram realizadas em 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.

3.2.9.7. Determinação da concentração de surfactina

A concentração de surfactina foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, acoplado com detector UV (Waters, modelo 2487) e equipado com a coluna de fase reversa Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm, Waters, Irlanda). A fase móvel utilizada consistiu de 20 % de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ a temperatura ambiente, aproximadamente 27°C. A surfactina foi detectada usando detector UV, modelo 2487 (Waters) a 205 nm. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração com surfactina padrão 95 % da Sigma-Aldrich (Yeh *et al.*, 2005).

3.2.9.8. Caracterização Química do Biossurfactante

3.2.9.8.1. Cromatografia de Camada Delgada

Placa de sílica gel 60 (Merk) foi utilizada na cromatografia de camada delgada. Amostras do biossurfactante produzido neste trabalho e padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) foram dissolvidas em clorofórmio/metanol (65:15 v/v). Após dissolução, aplicaram-se 5 gotas das amostras com um capilar na placa de sílica gel. Como eluente, utilizou-se uma mistura de clorofórmio/metanol/água (65:15:1 v/v). Após eluição, esperou-se 2 minutos e revelou-se a placa utilizando água destilada e aquecimento a 110°C por 15 minutos (Makkar e Cameotra, 1999).

3.2.9.8.2. Determinação de Carboidratos e Proteínas

A concentração de carboidratos no biossurfactante foi determinada pelo método de Dubois (Dubois *et al.*, 1956) e o conteúdo de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.9.8.3. Espectroscopia de Infravermelho

Amostras do biossurfactante purificado e da surfactina padrão (Sigma) foram submetidas à espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier utilizando espectro BIO-RAD FX-3000. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio e aplicou-se duas gotas em pastilhas duplas de KBR-5. Após evaporação do solvente em ambiente livre de umidade (dessecador), gerou-se o espectro entre 500 e 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.10. Screening para avaliar a produção de surfactina com diferentes cepas de *Bacillus* isoladas

Como os resultados obtidos na produção de surfactina por *B. subtilis* LAMI007 não foram satisfatórios, realizou-se um *screening* com doze cepas de *Bacillus* isoladas da Estação de Tratamento de Efluentes da Universidade Federal do Ceará.

A produção de biossurfactante pelas doze cepas foi acompanhada por dois métodos indiretos amplamente utilizados na literatura (Cooper e Goldenberg, 1987; Makkar e Cameotra, 1997; Lima Lobato *et al.*, 2002; Nitschke *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2001, Ramnani *et al.*, 2005): diminuição da tensão superficial do meio livre de células, após 48 horas de cultivo, e capacidade de emulsificar querosene e gasolina.

Inicialmente, as cepas foram inoculadas em meio APGE e incubadas a 30°C por 24 horas de crescimento. Após esse período, inoculou-se três alçadas da cultura em 100 mL de meio mineral contendo CAJC (10 g.L⁻¹), como fonte de carbono, e 0,1 % de solução de micro-nutrientes. Os frascos foram mantidos em mesa agitadora (*Shaker* Tecnal TE-480) a 30°C e 180 rpm por 48 horas. Após esse período, separou-se as células por centrifugação a 10000g por 20 minutos e o meio livre de células foi submetido à análise de Tensão Superficial e Índice de emulsificação (IE₂₄), utilizando querosene e gasolina (itens 3.2.9.6.1 e 3.2.9.6.2, respectivamente). Como controle negativo, utilizou-se o meio de cultivo sem inóculo. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Os resultados obtidos de tensão superficial foram analisados a partir da média e do erro de desvio padrão para cada cepa nos três ensaios conduzidos. Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os resultados obtidos, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman Keuls (comparações múltiplas) com nível de significância de 5 %. Para as análises estatísticas fez-se o uso do Programa Estatística versão 7.1 (Microsoft, Inc.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Caracterização do Suco de Caju

A composição físico-química do pedúnculo do caju varia largamente em função, da variedade, estado de maturação, tamanho, duração da colheita e variações ambientais regionais (Damasceno e Bezerra, 2002). Desta forma, neste trabalho, padronizou-se e caracterizou-se todo o suco utilizado, de forma a obter resultados confiáveis. Além disso, os microrganismos têm necessidades nutricionais que precisam ser satisfeitas pelo meio de cultivo utilizado. Portanto, esta caracterização indicou também se havia necessidade de suplementação do suco com nutrientes essenciais. As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os principais parâmetros avaliados para os sucos de caju integral e clarificado, respectivamente.

Tabela 4.1: Composição do suco de caju integral.

Parâmetro	Concentração
Glicose (g.L ⁻¹)	55,99 ± 1,3
Frutose (g.L ⁻¹)	47,89 ± 0,1
Proteínas solúveis (mg.mL ⁻¹)	0,73 ± 0,0
Proteínas Totais (mg.mL ⁻¹)	3,61 ± 0,2

pH = 4,47 ± 0,1

Pode-se observar que tanto o suco integral (Tabela 4.1) quanto o suco clarificado (Tabela 4.2) possuem uma elevada concentração de açúcares redutores, principalmente glicose e frutose. Além disso, os sais minerais (Tabela 4.2), principalmente ferro e manganês, considerados fatores importantes na produção de surfactante por *Bacillus* (Wei e Chu, 2002; Wei *et al.*, 2004), estão presentes na composição do suco de caju.

Tabela 4.2: Composição do suco de caju clarificado.

Parâmetro	Concentração
Glicose (g.L ⁻¹)	43,67 ± 0,3
Frutose (g.L ⁻¹)	42,43 ± 0,1
Proteínas solúveis (mg.mL ⁻¹)	0,10 ± 0,0
Proteínas Totais (mg.mL ⁻¹)	5,19 ± 0,0
Fósforo (g.L ⁻¹) ⁱ	1,21 ± 0,0
Potássio (g.L ⁻¹) ⁱ	13,13 ± 0,9
Cálcio (g.L ⁻¹) ⁱ	< DL
Magnésio (g.L ⁻¹) ⁱ	1,17 ± 0,1
Sódio (g.L ⁻¹) ⁱ	0,09 ± 0,0
Enxofre (g.L ⁻¹) ⁱ	0,81 ± 0,0
Cobre (mg.L ⁻¹) ⁱ	< DL
Ferro (mg.L ⁻¹) ⁱ	6,97 ± 2,7
Zinco (mg.L ⁻¹) ⁱ	11,20 ± 4,3
Manganês (mg.L ⁻¹) ⁱ	6,40 ± 0,4

pH = 4,32 ± 0,0

(i) Análises realizadas no laboratório de Biotecnologia - DETAL/UFC. < DL: Menor do que o detectável.

Price *et al.* (1975) estudaram aminoácidos livres presentes em diferentes amostras de suco de caju classificado, como: doce, azedo e adstringente, e observaram que os aminoácidos predominantes eram: alanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina e prolina. O triptofano foi encontrado em algumas amostras de suco e em quantidades muito pequenas. Outros aminoácidos presentes em pequenas quantidades foram metionina, cistina e histidina. Haendler & Duverneuil (1970) observaram a presença de altas concentrações de valina, ácido aspártico, treonina, lisina e alanina, porém, somente traços de prolina e serina foram determinados. Estes autores constataram a ausência de metionina no suco. A Tabela 4.3 mostra concentrações de aminoácidos presentes no suco de caju, integral e clarificado, utilizado neste trabalho.

Tabela 4.3: Aminoácidos presentes no suco de caju integral (CAJN) e clarificado (CAJC) utilizados como substrato para a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145 e *B. subtilis* LAMI007, respectivamente.

Aminoácidos	CAJN Concentração ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)	CAJC Concentração ($\mu\text{mol.mL}^{-1}$)
Ácido aspártico	128,94	104,04
Ácido glutâmico	181,45	146,55
Serina	172,42	147,90
Glicina	224,34	187,60
Histidina	33,10	26,14
Treonina	371,47	355,83
Alanina	284,75	242,88
Prolina	152,13	138,41
Tirosina	81,76	73,43
Valina	27,94	30,66
Metionina	7,38	5,08
Cisteína	9,74	10,38
Isoleucina	39,00	41,15
Leucina	99,44	81,93
Fenilalanina	12,86	13,05
Lisina	13,09	11,78

Quando substratos alternativos, como resíduos agroindustriais, são avaliados como meio de cultura é importante considerar as variações de composição que são comuns e naturais neste tipo de subprodutos. Portanto, é muito importante não apenas selecionar microrganismos adaptados a estes substratos bem como buscar linhagens que apresentem maior versatilidade em relação à composição do meio. Neste sentido, o suco de caju aparece como um substrato adequado para a cultura de microrganismos, pois apresenta elevada quantidade de açúcares redutores, bem como macronutrientes, aminoácidos e micronutrientes. O suco, no entanto, apresenta baixa concentração de proteínas solúveis e totais, as quais servem como fonte de nitrogênio (Tabela 4.1 e 4.2).

4.2. Produção e Caracterização de Biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

4.2.1. Estudos iniciais em frascos agitados

O crescimento e a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145 utilizando suco de caju integral (CAJN) como substrato, foram avaliados e comparados aos resultados obtidos utilizando meio complexo (caldo nutritivo). Diversos parâmetros de processo foram monitorados durante o curso do ensaio fermentativo e os resultados estão apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2, para o meio caldo nutritivo e CAJN diluído de 1:10, respectivamente. A variação da concentração de biomassa (densidade óptica) nos dois ensaios é uma curva típica de crescimento microbiano. O mesmo comportamento foi observado para diversos autores com diferentes microorganismos (Nitschke e Pastore, 2002; Lobato Lima *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002). Observou-se ainda que o pH do meio, em caldo nutritivo, permaneceu praticamente constante. Quando CAJN foi utilizado, o pH foi lentamente diminuindo até atingir valores muito ácidos (em torno de 2,3). Quanto ao consumo dos açúcares presente no suco, o microorganismo consumiu apenas glicose, e não houve consumo de frutose (Figura 4.2). Ressalta-se que não foram adicionados açúcares redutores ao caldo nutritivo.

A Figura 4.3 apresenta a cinética de crescimento e evolução da tensão superficial durante a fermentação em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 e suplementado com óleo de soja (CAJNS). Pode-se observar que este meio não proporcionou um alto crescimento celular, obtendo-se apenas uma densidade óptica de 0,45 com 48 horas de cultivo. Tampouco se obteve uma redução significativa na tensão superficial, que passou de 68 a 47 dina.cm⁻¹ após 72 horas de cultivo. Verificou-se ainda que o microorganismo consumiu preferencialmente a glicose presente no suco, e mais lentamente a frutose.

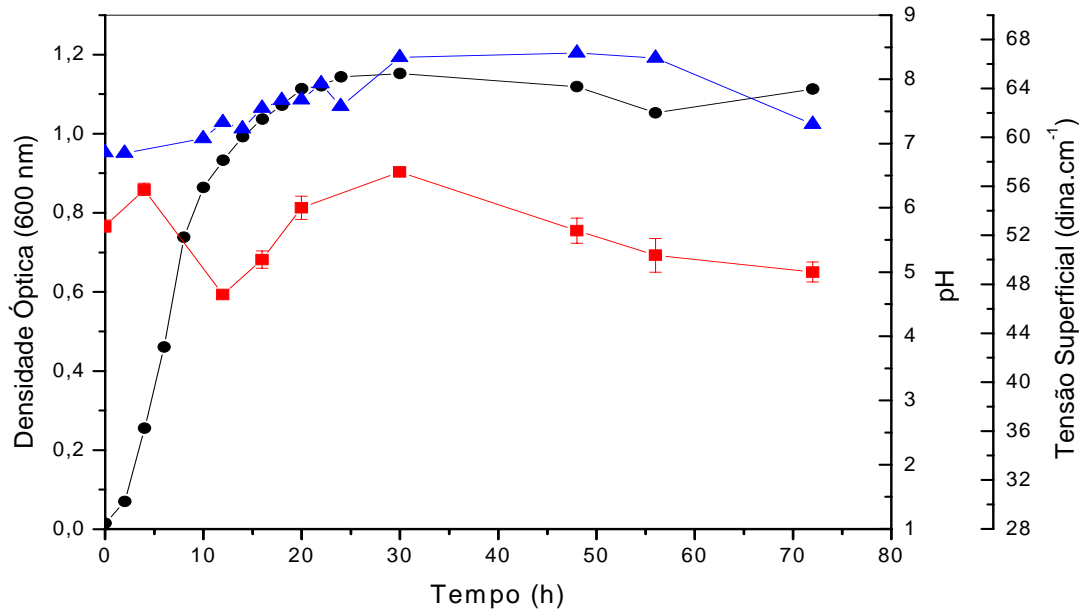


Figura 4.1: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em caldo nutritivo: (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH.

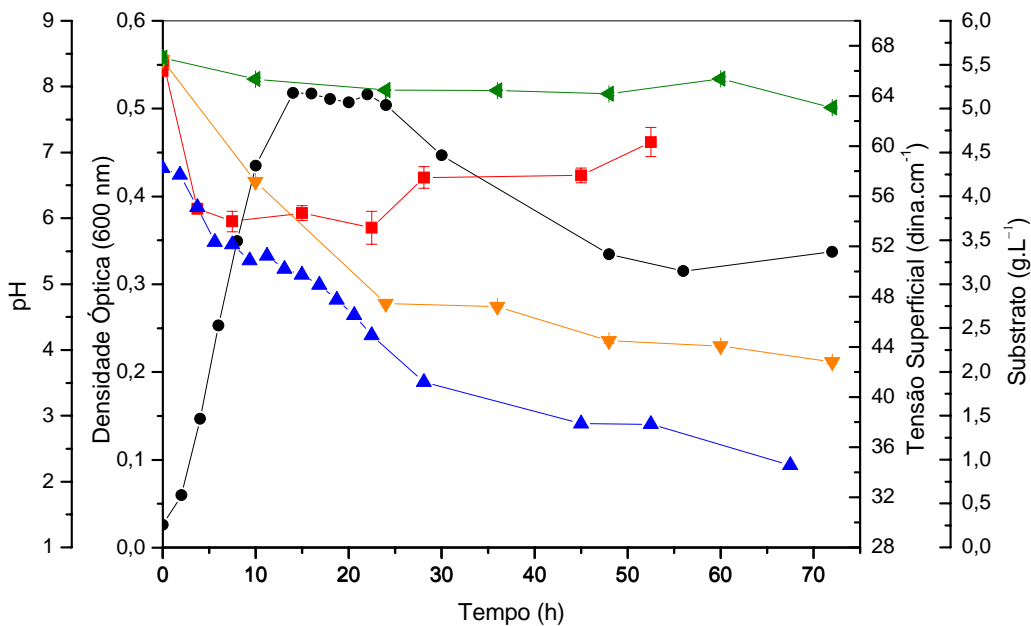


Figura 4.2: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10: (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◄) Concentração de frutose (g.L⁻¹).

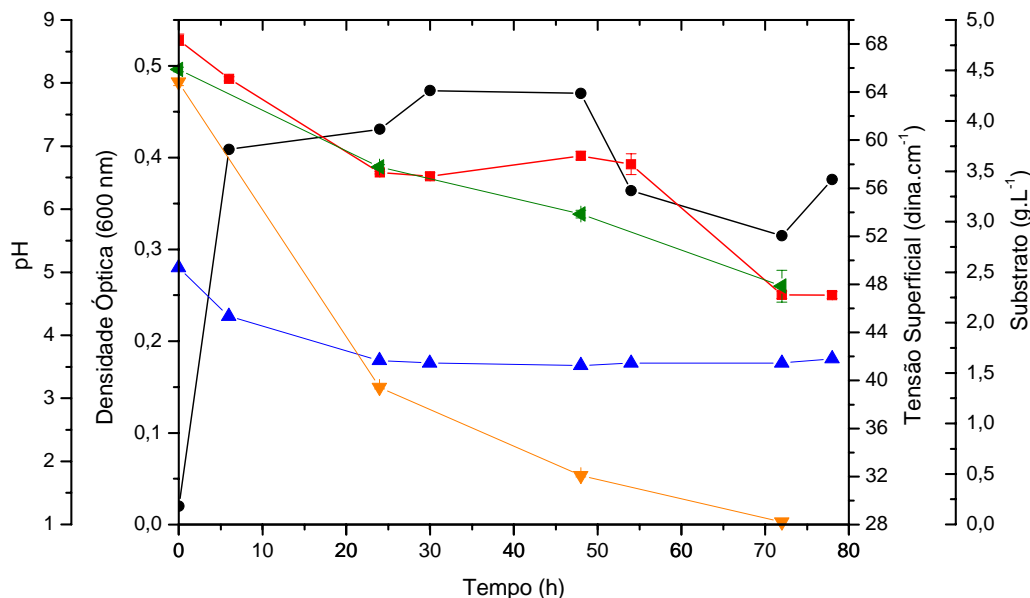


Figura 4.3: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 e suplementado com óleo de soja 2 % (v/v): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◄) Concentração de frutose (g.L⁻¹).

A Tabela 4.4 mostra os resultados do crescimento da bactéria *P. aeruginosa* ATCC 10145 e o valor final do pH do meio de cultivo. A concentração celular (massa seca) obtida quando se utilizou tanto caldo nutritivo como CAJN foi muito próxima variando entre 0,88 e 0,98 g.L⁻¹, com 20 horas de cultivo. Porém, no meio suco de caju integral diluído de 1:10 e suplementado com óleo de soja (CAJNS), observou-se um menor crescimento de biomassa cuja concentração foi de 0,64 g.L⁻¹. No meio CAJN a maior biomassa foi obtida com 20 horas de cultivo, no entanto com caldo nutritivo obteve-se com 76 horas (1,08 g.L⁻¹). Estes resultados mostram que o suco de caju pode ser utilizado como substrato para o crescimento microbiano.

Tabela 4.4: Influência do meio de cultivo no crescimento da cepa *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Meio de Cultura	Biomassa (g.L ⁻¹)	Densidade óptica (600 nm)	pH Final
Caldo Nutritivo	0,88	1,118 ± 0,066	8,43 ± 0,85
Suco de Caju diluído de 1:10 (CAJN)	0,98	0,418 ± 0,126	3,69 ± 0,75
CAJNS ⁱ	0,64	0,431	3,60

(i) Este ensaio não foi realizado em duplicata.

Pode-se observar também (Figuras 4.1 a 4.3 e Tabela 4.5), que não houve uma redução significativa da tensão superficial nos diferentes meios de cultura testados, sendo que o menor valor obtido foi de aproximadamente 54 dina.cm⁻¹, indicando que provavelmente não houve produção de biossurfactante nesses ensaios. De acordo com a literatura (Lima Lobato *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002), tensões abaixo de 30 dina.cm⁻¹ são obtidas quando há acentuada produção do surfactante. O menor valor de tensão superficial foi obtido em diferentes tempos nos diferentes meios de cultivo (Tabela 4.5).

Uma possível explicação ao baixo rendimento na produção de biossurfactante, (medido indiretamente através da redução na tensão superficial), quando se utilizou suco de caju é a baixa concentração de fontes de nitrogênio, que segundo alguns autores (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Lin, 1996; Mulligan e Gibbs, 1989b e 1993), é um nutriente importante para o crescimento celular e produção do produto de interesse. Desta forma, realizou-se ensaios para avaliar a influência da suplementação do suco de caju com diferentes fontes de nitrogênio (orgânicas e inorgânicas) na produção do biossurfactante.

Tabela 4.5: Influência do meio de cultivo no crescimento e produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145: caldo nutritivo (CN), suco de caju diluído de 1:10 (CAJN) e suco de caju diluído de 1:10 e suplementado com óleo de soja (CAJNS).

Meio de Cultura	Tensão Superficial Inicial (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após cultivo (dina.cm ⁻¹)	Redução da Tensão Superficial (%)
CN	52,75 ± 0,5	47,17 ± 0,3 ⁱⁱⁱ	10,58
CAJN	66,00 ± 0,0	44,37 ± 0,5 ⁱ	32,87
CAJNS	68,35 ± 0,5	47,13 ± 0,3 ⁱⁱ	31,04

(i) Com 72h de cultivo; (ii) Com 24h de cultivo; (iii) Com 12h de cultivo.

4.2.2. Influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

Objetivando o aumento da produção de biossurfactante, estudou-se a suplementação do CAJN com diferentes fontes de nitrogênio, tanto orgânicas (peptona) como inorgânicas (NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄). As Figuras 4.4 a 4.6 mostram a cinética de produção do biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju suplementado com as diferentes fontes de nitrogênio.

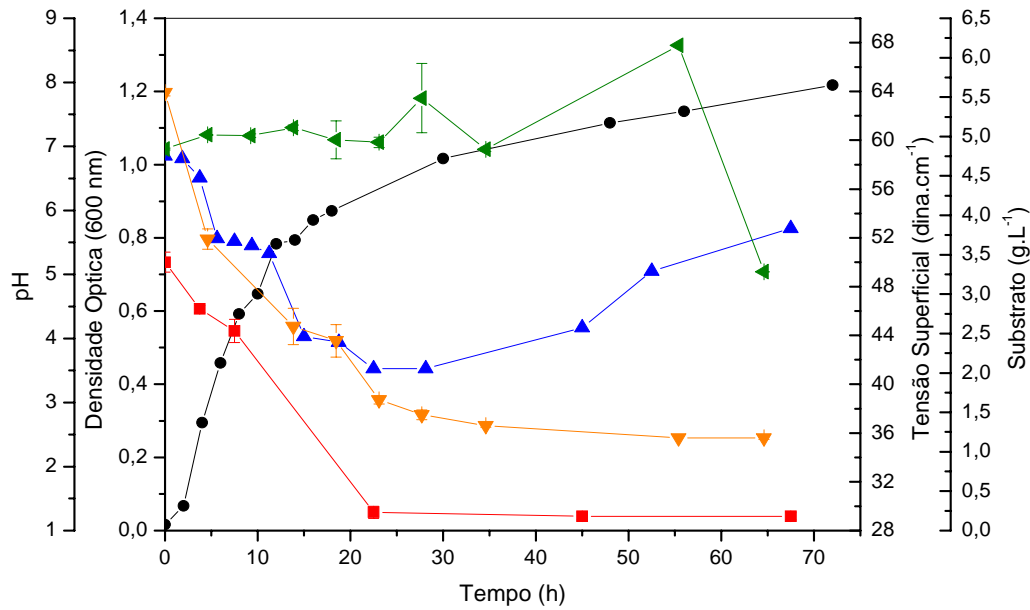


Figura 4.4: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 suplementado com peptona (5 g.L⁻¹): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◄)Concentração de frutose (g.L⁻¹).

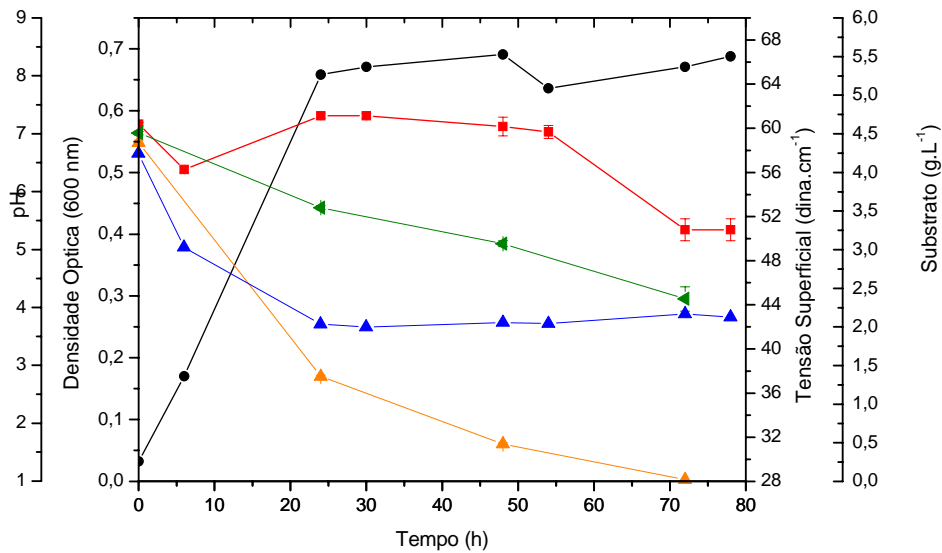


Figura 4.5: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 e suplementado com (NH₄)₂SO₄ (5 g.L⁻¹): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◄)Concentração de frutose (g.L⁻¹).

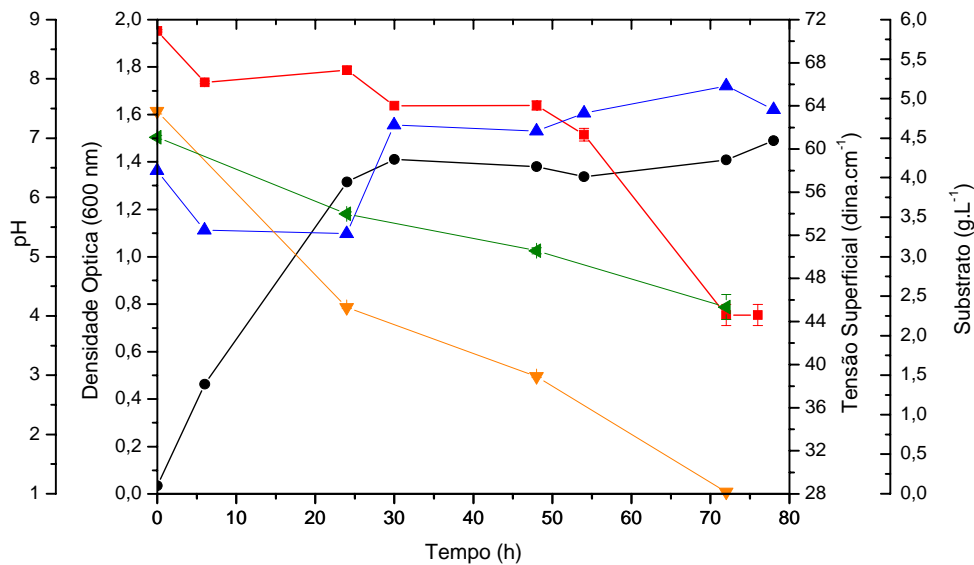


Figura 4.6: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral (CAJN) diluído de 1:10 e suplementado com NaNO₃ (5 g.L⁻¹): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◄) Concentração de frutose (g.L⁻¹).

Nas Figuras 4.4 a 4.6, pode-se observar que houve consumo preferencial de glicose durante o cultivo, ocorrendo pequena variação na concentração de frutose durante a fermentação. O comportamento do pH do meio variou conforme a fonte de nitrogênio usada para a suplementação. No ensaio contendo peptona ou NaNO₃, o pH diminuiu e depois aumentou quando a cultura atingiu a fase estacionária. Quando (NH₄)₂SO₄ foi utilizado, o pH diminuiu até valores próximos a 3,5 e depois permaneceu constante quando a cultura atingiu a fase estacionária.

A Tabela 4.6 apresenta os resultados da produção de biossurfactante pela bactéria *P. aeruginosa* ATCC 10145 nos diferentes meios estudados. Todos os meios de cultivo avaliados favoreceram a produção extracelular do biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145, que foi estimada pela redução da tensão superficial do meio fermentativo. A maior redução na tensão superficial (41 %) foi obtida no suco de caju suplementado com peptona (CAJNP) após 24h de cultivo.

Tabela 4.6: Efeito da suplementação do suco de caju com diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145. Meios de cultura: caldo nutritivo (CN), suco de caju diluído 1:10 (CAJN), Suco de caju diluído 1:10 e suplementado com 5 g.L⁻¹ de peptona (CAJNP), suco de caju diluído 1:10 e suplementado com 5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ (CAJNH₄) e suco de caju diluído 1:10 e suplementado com 5 g.L⁻¹ de NaNO₃ (CAJNaNO₃).

Meio de Cultura	Tensão Superficial Inicial (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após cultivo (dina.cm ⁻¹)	Redução da Tensão Superficial (%)
CAJN	66,00 ± 0,00	44,37 ± 0,48 ⁱⁱ	32,77
CAJNP	50,00 ± 0,81	29,50 ± 0,50 ⁱ	41,00
CAJNH ₄	60,37 ± 0,15	50,80 ± 1,00 ⁱⁱ	15,85
CAJNaNO ₃	70,95 ± 0,10	44,60 ± 0,98 ⁱⁱ	37,14

(i) Com 24 h de cultivo e (ii) Com 72 h de cultivo.

Ao suplementar o meio CAJN com peptona, como fonte de nitrogênio, a tensão superficial do meio de cultivo, após 24 h, foi reduzida de 50 para 29,5 dina.cm⁻¹ e permaneceu constante por 72 horas (Figura 4.4). Segundo Benincasa *et al.* (2002) *P. aeruginosa* foi capaz de reduzir a tensão superficial de meio complexo *soapstock* de 57,5 para 32,9 dina.cm⁻¹.

A tensão superficial mínima, no meio CAJNP, foi atingida após 24 horas, portanto, neste tempo de cultivo a concentração de surfactante presente já se encontrava acima da concentração micelar crítica (CMC) e um aumento na concentração de biossurfactante produzido não reduziria mais a tensão superficial. Alguns autores (Lima Lobato *et al.*, 2002; Ferraz *et al.*, 2002) obtiveram o mesmo comportamento e explanaram que na presença de baixas concentrações de biossurfactantes, a concentração micelar crítica pode ser atingida, não mais se observando variação na tensão superficial do meio.

Este resultado demonstra que o suco de caju suplementado com peptona (CAJNP) constituiu em um meio de cultura alternativo capaz de suportar o crescimento

microbiano e a biossíntese de surfactantes. Os carboidratos foram utilizados como fonte de carbono e a concentração de nitrogênio parece ser adequada ao crescimento celular e produção de biosurfactante.

A biossíntese de biosurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145 foi maior na fase exponencial de crescimento celular, obtendo uma tensão superficial de 29,5 dina.cm⁻¹ com 24 horas de cultivo. Então, fazendo-se uma comparação do crescimento celular, consumo de substrato e tensão superficial do meio fermentado (Figuras 4.1 a 4.6), observou-se que a produção do biosurfactante aconteceu, geralmente, de forma associada ao crescimento, tal comportamento observado é típico de um metabólito primário. Vários biosurfactantes, tais como: biotensoativos de *Candida tropicalis* IIP-4, glicolípideos de *Nocardia* sp. SFC-D e biosurfactantes insolúveis em água de *Torulopsis apicola*, são metabólitos secundários (Desai e Banat, 1987). Outros, como alguns ramnolípideos produzidos por *Pseudomonas* sp., glicoproteínas de *P. fluorescens* 378, agentes com atividade superficial de *B. cereus* IAF 346 e biodispersan de *Bacillus* sp. IAF-343 são considerados associados ao crescimento (Desai e Banat, 1987).

4.2.3. Influência da suplementação do meio CAJNP com diferentes fontes de carbono na produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

Lang e Wullbrandt (1999), Benincasa *et al.* (2002) e Costa *et al.* (2005) relataram diferentes fontes de carbono para produção de ramnolípideos por *P. aeruginosa*, como por exemplo: glicerol, glicose, n-alcanos, triglicerídeos, óleo de soja e óleo de canola. Baseado nestas informações, fez-se ensaios onde avaliou-se a influência da suplementação do meio CAJNP com glicerol e óleo de soja, como fonte de carbono, na produção do biosurfactante.

A Figura 4.7 mostra o efeito da suplementação do meio CAJNP com glicerol na produção do biosurfactante. Pode-se observar que com esse meio de cultivo, conseguiu-se um alto crescimento celular com uma densidade óptica de 5,0 com 48 horas de ensaio, porém houve uma pequena redução na tensão superficial (16,51 %). Este resultado é semelhante com os obtidos por Sim *et al.* (1997), cuja produção de

ramnolípideos foi entre 0 e 1,2 g.L⁻¹ quando etanol, glicerol e glicose foram utilizadas como fonte de carbono por *P. aeruginosa* UW-1. Entretanto, estes autores obtiveram altas concentrações de biossurfactante, na faixa de 11 a 24 g.L⁻¹, quando utilizaram óleo de soja e canola.

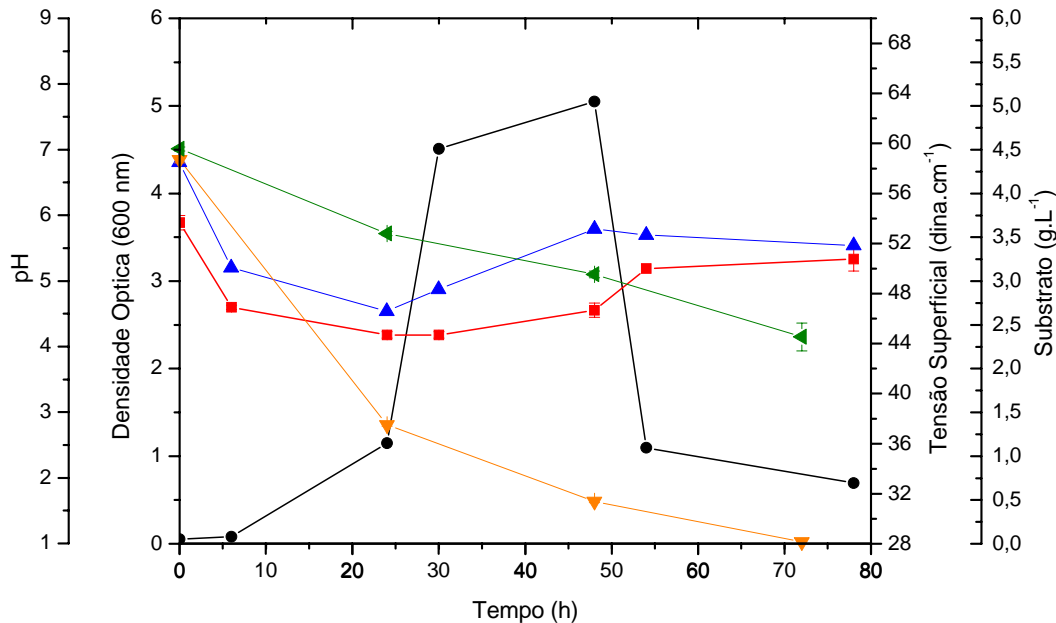


Figura 4.7: Perfil de crescimento e produção de biossurfactante a 30°C e 150 rpm de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju integral diluído de 1:10, contendo peptona (5g.L⁻¹) e suplementado com glicerol 2% (p/v): (●) Densidade óptica; (■) Tensão Superficial; (▲) pH; (▼) Concentração de glicose (g.L⁻¹); (◀) Concentração de frutose (g.L⁻¹).

Devido vários autores (Costa *et al.*, 2005; Mata-Sandoval, *et al.*, 1999; Ramnani *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 1997) reportarem o uso de óleos de planta como substratos na produção de ramnolípideo e terem obtidos resultados favoráveis, estudou-se a influência da suplementação de CAJNP com óleo de soja na produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145.

A Tabela 4.7 apresenta os valores das tensões superficiais do meio fermentado por *P. aeruginosa* ATCC 10145 utilizando CAJNP suplementado com diferentes fontes de carbono. A adição de fonte de carbono no meio suco de caju suplementado com

peptona (CAJNP) não aumentou a produção de biossurfactantes, ou seja, não ocorreu uma maior redução na tensão superficial (do meio de cultura, livres de células). A redução da tensão superficial, quando utilizou CAJNP suplementado com óleo de soja, foi de 30,50 %, e usando glicerol como suplementação foi alcançando uma redução de 16,71 %. Comparando o resultado da suplementação com glicerol e óleo de soja, a diferença do rendimento dos dois meios pode ser resultado da composição do óleo de soja (presença de triglicerídeos) ou da especificidade da lipase de *P. aeruginosa* produzida no meio (Costa *et al.*, 2006). Além disso, o óleo de soja contém ácidos graxos, sendo utilizados pelo microrganismo como fonte de carbono e de minerais, que são elementos importantes no estímulo celular e na produção de biossurfactantes (Ilori *et al.*, 2005).

Tabela 4.7: Influência da suplementação do meio de cultivo CAJNP com diferentes fontes de carbono (glicerol e óleo de soja) no crescimento e produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 10145.

Meio de Cultura	Tensão Superficial Inicial (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após cultivo (dina.cm ⁻¹)	Redução da Tensão Superficial (%)
CAJNP	50,00 ± 0,8	29,50 ± 0,5 ⁱ	41,00
CAJNP + glicerol	53,67 ± 0,6	44,70 ± 0,9 ⁱⁱ	16,71
CAJNP + óleo de soja	68,35 ± 0,5	47,50 ± 1,0 ⁱⁱ	30,50

(i) Com 12h de cultivo e (ii) Com 24h de cultivo.

4.2.4. Caracterização do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

Com a finalidade de investigar possíveis aplicações do biossurfactante obtido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em CAJNP, procedeu-se estudos de atividade emulsificante. Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersada como gotas microscópicas em uma outra fase contínua líquida, sendo que as ambas as fases, são imiscíveis entre si (Desai e Banat, 1997). Para avaliar a capacidade de formar

emulsões, diversos hidrocarbonetos (hexano, heptano, gasolina e querosene) e óleo de soja foram colocados em contato com o biossurfactante, e os resultados são mostrados na Figura 4.8. A Figura 4.9 mostra uma fotografia da emulsão obtida quando se utilizou o biossurfactante e querosene. Todos os hidrocarbonetos avaliados foram emulsionados pelo biossurfactante. O maior índice de emulsificação foi obtido com óleo de soja (71,79 % de emulsificação), enquanto o menor índice foi com querosene (16,50 % de emulsificação). A maioria de surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta (Ilori *et al.*, 2005).

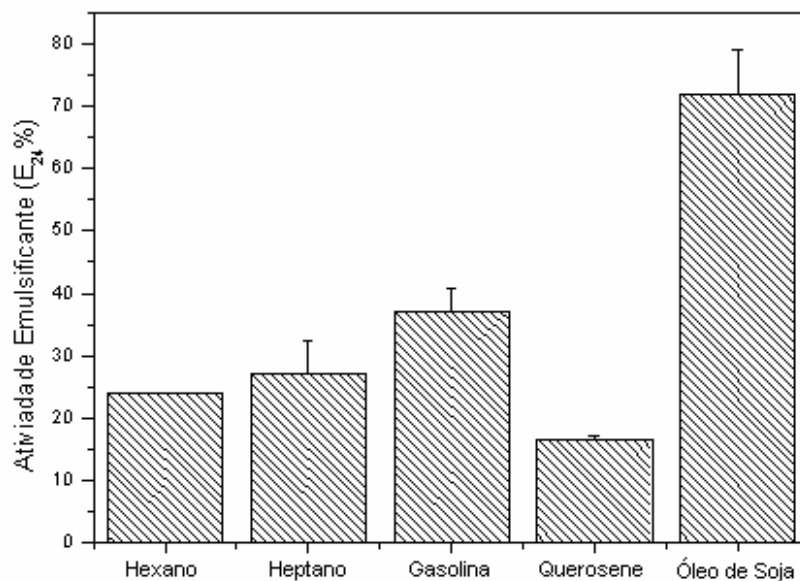


Figura 4.8: Atividade Emulsificante (IE₂₄%) do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio suco de caju suplementado com peptona (CAJNP), frente a diferentes substratos: hidrocarbonetos e óleo de soja. Barras de erros representam o desvio padrão.

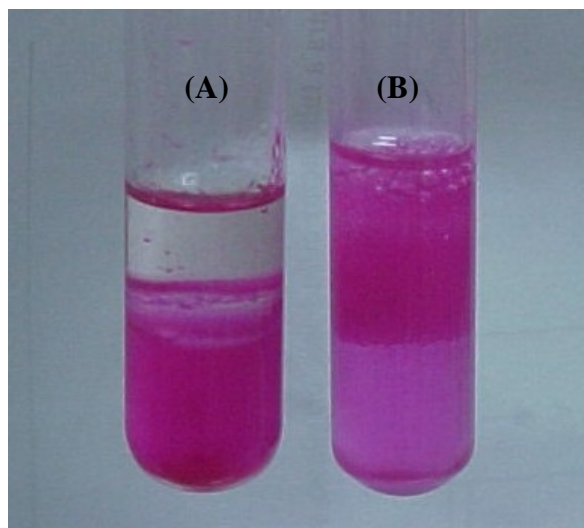


Figura 4.9: Emulsificação do querosene pelo biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju suplementado com peptona (CAJNP): (A) 0 hora de cultivo e (B) 24 horas de cultivo.

A Figura 4.10 apresenta uma foto do biosurfactante, na forma de cristais, após recuperação através da acidificação do sobrenadante, livre de células de *P. aeruginosa* ATCC 10145, utilizando como meio de cultivo CAJNP.



Figura 4.10: Cristais do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em CAJNP, recuperado após acidificação do meio livre de células. Foto obtida utilizando microscópio com magnitude de 100x.

Através de análises realizadas utilizando o método descrito por Bradford (1976) pode observar que nenhuma proteína foi detectada no extrato contendo biossurfactante, no entanto, observou-se a presença de carboidratos (dados não apresentados).

4.2.5. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por fermentação de CAJNP por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 frente a variações de pH, temperatura e concentração de NaCl

Fatores ambientais como salinidade, pH e temperatura afetam a atividade do biossurfactante (Ilori *et al.*, 2005). Desta forma, estudou-se a estabilidade do biossurfactante produzido neste trabalho usando CAJNP como meio de cultivo por *P. aeruginosa* ATCC 10145. As Figuras 4.11 a 4.13 apresentam a estabilidade do biossurfactante frente a diferentes concentrações de NaCl, modificação de pH do meio e diferentes tempos de exposição à temperatura de 100°C, respectivamente.

Pode-se observar pela Figura 4.11, que não houve aumento expressivo na tensão superficial do biossurfactante quando exposto a diferentes concentrações de cloreto de sódio, variando de 0 a 20 % (p/v). Uma análise estatística, realizada utilizando o software Origin versão 6.0, mostrou que não houve diferença significativa, com 95 % de confiança, entre os valores de tensão superficial nas diferentes concentrações de NaCl (Anexo B1). Este resultado é interessante quando se considera o uso de biossurfactante na bioremediação de ambientes salinos, como na recuperação de derramamentos de petróleo em ambientes marinhos. Segundo Nitschke e Pastore, (2002), os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl enquanto que concentrações salina de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais.

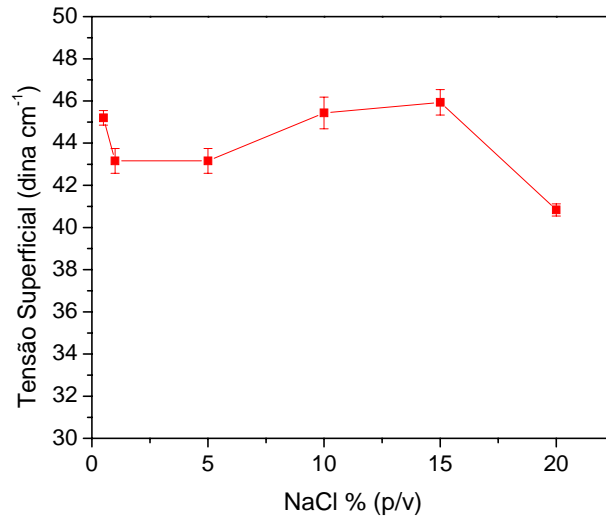


Figura 4.11: Efeito da concentração de NaCl na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJNP a 30°C e 150 rpm.

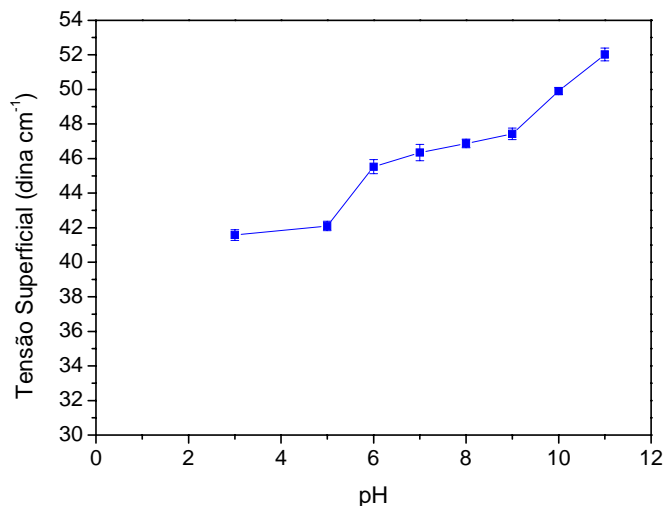


Figura 4.12: Efeito do pH na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJNP a 30°C e 150 rpm.

Na Figura 4.12 pode-se observar que houve uma diminuição da atividade tensoativa na faixa de pH entre 6 e 9, enquanto que, na faixa de pH de 3 a 5, a atividade tensoativa se manteve praticamente constante. Porém, através da análise estatística realizada utilizando o software Origin versão 6.0, verificou-se que não há diferença

significativa, com 95 % de confiança, entre os valores de tensão superficial nos diferentes valores de pH estudados (ver anexo B2).

Com os resultados do tratamento térmico, Figura 4.13, pode-se observar que a tensão superficial diminuiu após exposição a altas temperaturas (100°C), por 75 minutos, ou quando submetida à esterilização em autoclave (121°C por 15 min). No entanto, uma análise estatística realizada (software Origin 6.0), também mostrou que não há diferença significativa, com 95 % de confiança, entre os valores de tensão superficial ao longo do tempo de exposição a 100°C ou por 15 min a 121°C (Anexo B3).

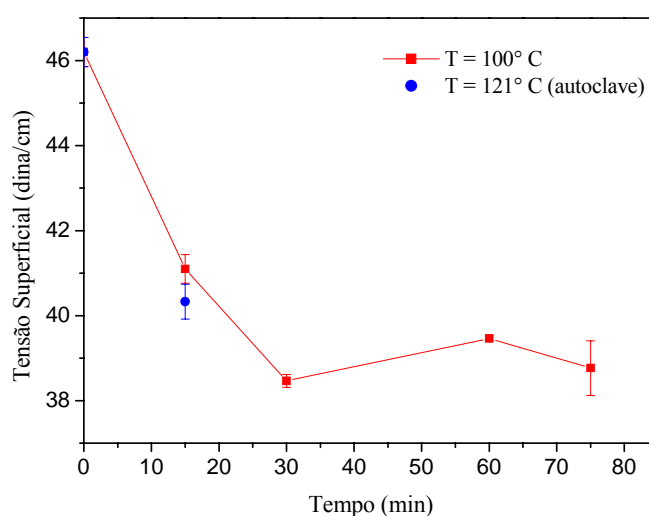


Figura 4.13: Efeito do tempo de exposição à temperatura de 100°C na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJNP a 30°C e 150 rpm.

Biossurfactantes que apresentam elevada estabilidade frente à temperatura e pH podem ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por 140 h e pH entre 5 e 12 (Horowitz *et al.*, 1990). Ilori *et al.* (2005) avaliou a estabilidade do biossurfactante produzido por *Aeromonas ssp.*, e verificou que este apresentava melhor atividade surfactante na concentração de 5 %, pH de 8,0 e temperatura de 40°C, e permaneceu com 77 % de sua atividade após exposto por 120 min a 100°C. Levando em consideração os relatos de literatura, o biossurfactante produzido neste trabalho também

é adequado para aplicações em biorremediação, como, por exemplo, em derramamento de petróleo e seus derivados em mares ou solos, uma vez que é estável na presença de altas concentrações de NaCl, na faixa de pH estudada e quando exposto a altas temperaturas.

4.2.6. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* LAMI em fermentador de bancada

Com o objetivo de estudar a cinética de produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* LAMI, isolada do derramamento de petróleo na costa cearense, realizaram-se dois ensaios em fermentador de bancada. Dois meios de cultivo, que apresentaram resultados satisfatórios em estudos realizados em frascos agitados foram utilizados: suco de caju integral diluído para se obter uma concentração inicial de 5 g.L⁻¹ de glicose, suplementado com peptona (CAJNP) ou NaNO₃ (CAJNaNO₃), ambas na concentração de 5 g.L⁻¹. A fermentação foi conduzida a 30°C, 200 rpm e sem aeração, com 3 L de volume de meio e 2 % de inóculo. A Tabela 4.8 apresenta os resultados das tensões superficiais obtidas após 24 horas de cultivo no biorreator utilizando os dois meios de cultivo.

Baseado nos resultados obtidos em frascos agitados (diminuição de 41 % da tensão superficial no meio CAJNP) esperava-se que houvesse a produção de biossurfactantes, em ensaio conduzido no fermentador, utilizando o mesmo meio de cultura (CAJNP) após 24 horas de cultivo. No entanto, não se obteve diminuição da tensão superficial após esse intervalo no fermentador (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* LAMI, em fermentador de bancada de 5 L de volume útil a 30°C e 200 rpm, utilizando os meios de cultivo: suco de caju integral, diluído para se obter uma concentração inicial de 5 g.L⁻¹ de glicose, suplementado com peptona (CAJNP) ou com NaNO₃ (CAJNaNO₃).

Meio de Cultivo	Tensão Superficial Inicial (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após de cultivo – 24 h (dina.cm ⁻¹)	Redução da Tensão Superficial (%)
CAJP	50,75 ± 0,9	52,68 ± 1,2	0,0
CAJNaNO ₃	54,25 ± 1,0	42,00 ± 0,0	22,58

O fato de não ter ocorrido diminuição na tensão superficial, se deve a falta de aeração ou o tempo de cultivo foi insuficiente para promover a produção. Desta forma, novo ensaio foi realizado, utilizando o meio CAJN suplementado com NaNO_3 , para avaliar a produção de biossurfactante por até 96 horas de cultivo.

A Figura 4.14 mostra a concentração de substrato (glicose e frutose, carboidratos presentes no suco de caju, g.L^{-1}) e a cinética de produção de biossurfactante, acompanhada pela redução da medida da tensão superficial, por *P. aeruginosa* em meio CAJNaNO₃. Observou-se que o microrganismo consumiu glicose e frutose simultaneamente e que a produção do biossurfactante acompanhou o consumo de substrato.

Comparando os dois meios de cultivo avaliados, o meio CAJNaNO₃ foi o mais adequado, nas condições estudadas para a produção de biossurfactante em fermentador de bancada, uma vez que se observou redução na tensão superficial de 22,58 % após 24 h de cultivo e 63,59 % após 72 horas. Após este período, a tensão superficial atingiu aproximadamente 34 dina.cm^{-1} , valor próximo ao recomendado pela literatura (29 dina.cm^{-1}).

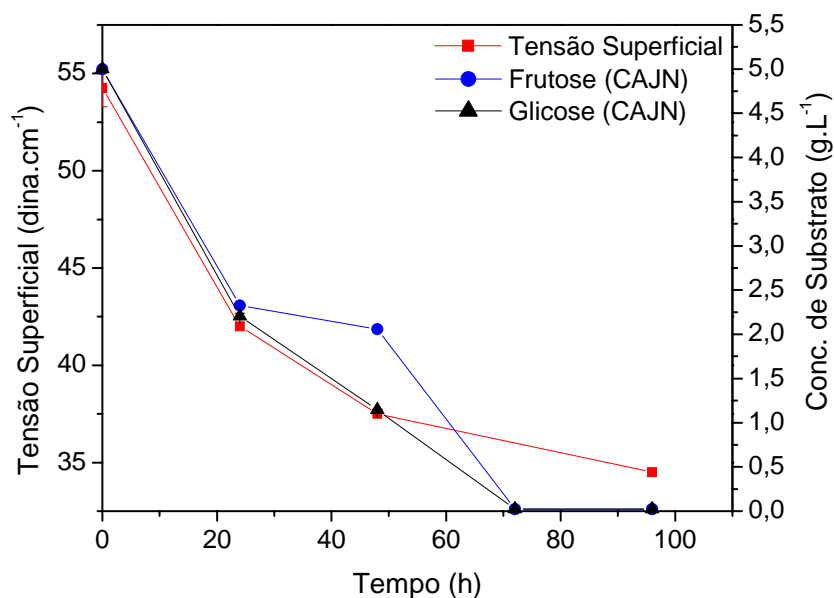


Figura 4.14: Produção de biossurfactante (acompanhado pela diminuição da tensão superficial do meio) e consumo de substrato durante o cultivo de *P. aeruginosa* LAMI, em CAJNaNO₃ no fermentador de bancada de 5 L a 30°C e agitação de 200 rpm.

4.3. Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI007

4.3.1. Ensaios preliminares de crescimento e produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI007 utilizando suco de caju integral com substrato

A seleção do meio de cultivo mais adequado para *B. subtilis* LAMI007 foi baseado na habilidade do microrganismo em crescer e produzir biossurfactante, sendo esta avaliada através da atividade emulsificante do querosene.

É sabido que bactérias como *B. subtilis* são capazes de crescer na faixa de pH entre 5,0 e 12,0 (Paes, 2006). Baseado nesta informação realizou-se estudo cinético de crescimento e produção de biossurfactante utilizando suco de caju (10 % v/v) a pH 7,0, como meio de cultivo, e caldo nutritivo (Biolife, Itália), aqui utilizado como controle. A Figura 4.15 mostra a evolução da biomassa e do pH em função do tempo durante os ensaios fermentativos utilizando suco de caju e caldo nutritivo como meio de cultivo. Quando o microrganismo foi cultivado em caldo nutritivo, nota-se que a variação da concentração de biomassa é uma curva típica de crescimento microbiano apresentando fase de adaptação, exponencial, estacionária e de morte. Observa-se ainda que houve um decréscimo no pH, o que indica atividade celular. Porém, quando cultivado em suco de caju, não ocorreu variação na densidade óptica a 600 nm, indicando que não houve crescimento celular. Tampouco se observou consumo de açúcares no suco de caju e o pH permaneceu aproximadamente constante. Estes resultados indicam que o suco de caju diluído, não é um substrato adequado para o crescimento da cepa de *B. subtilis* utilizada.

A Figura 4.16 mostra resultados de tensão superficial do sobrenadante livre de células, uma medida indireta da produção de biossurfactantes, para os dois meios de cultivo estudados. Observa-se que a tensão superficial permanece constante no suco de caju diluído. Para o ensaio com caldo nutritivo, a tensão superficial permaneceu constante durante as 72 h de ensaio. Este resultado indica que não houve produção de biossurfactantes, pois caso houvesse, a tensão superficial do meio seria reduzida.

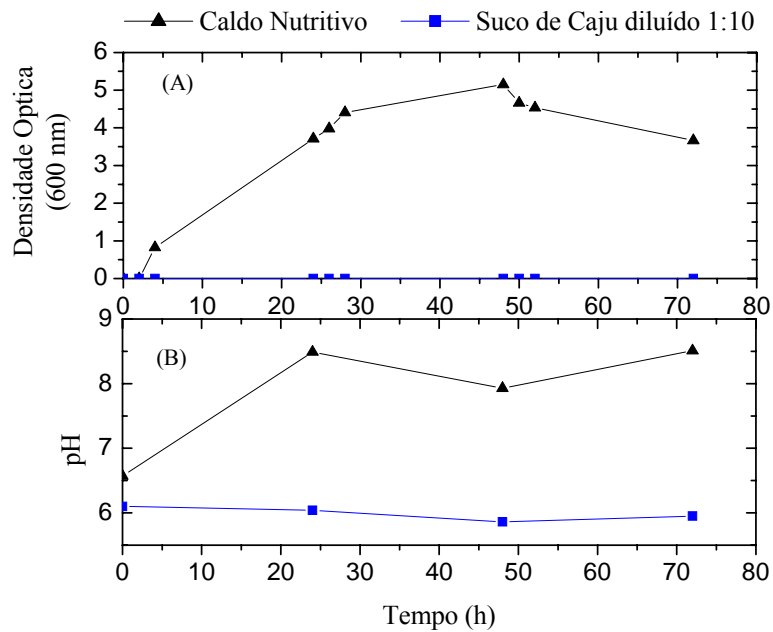


Figura 4.15: Perfil da biomassa (A) e do pH (B) em função do tempo durante fermentação a 30°C e 150 rpm por *B. subtilis* LAMI007 nos meios: (▲) caldo nutritivo e (■) suco de caju diluído de 1:10 (v/v).

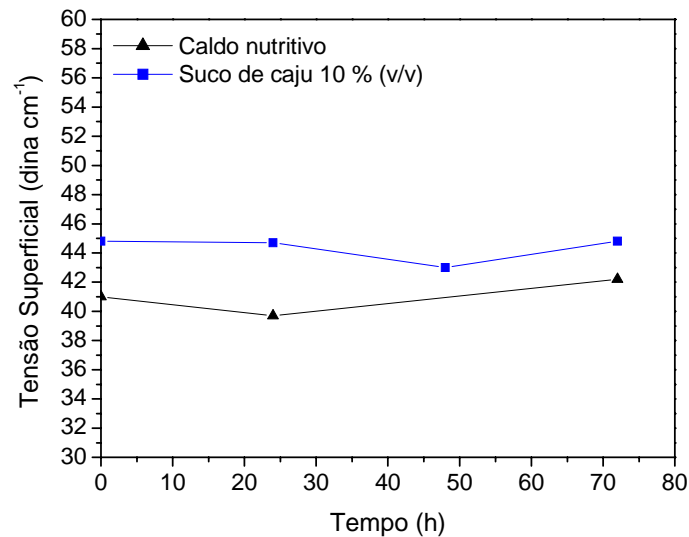


Figura 4.16: Variação da tensão superficial do meio livre de células em função do tempo durante a fermentação a 30°C e 150 rpm usando o *B. subtilis* LAMI007 nos meios: (▲) caldo nutritivo e (■) suco de caju 10 % (v/v).

Segundo diversos autores (Makkar e Cameotra, 1999; Peypox *et al.*, 1999; Sandrin *et al.*, 1990; Yei *et al.*, 2005) glicose e frutose são substratos adequados para a

síntese da surfactina, e estes carboidratos estão presentes no suco de caju. Um dos motivos que podem estar influenciando o crescimento celular é a baixa concentração dessa fonte de carbono presente no meio de cultivo, uma vez que o suco foi diluído com água na proporção de 10 % (v/v). Desta forma, variou-se a diluição do suco de caju entre 10 e 50 % (v/v). No entanto, tampouco se observou crescimento celular (dados não apresentados). Este resultado indica que outros nutrientes deveriam ser adicionados ao suco.

4.3.2. Influência da suplementação do suco de caju integral com fontes de nitrogênio na produção de biosurfactante utilizando *Bacillus subtilis* LAMI007

Como um simples aumento na concentração de açúcares presentes no meio de cultivo formulado com suco de caju não promoveu crescimento celular, avaliou-se a suplementação com diferentes fontes de nitrogênio, uma vez que o suco de caju é pobre em fontes de nitrogênio (Tabela 4.1). A Figura 4.17 ilustra o perfil da biomassa e do pH no meio de cultivo suco de caju suplementando com peptona ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

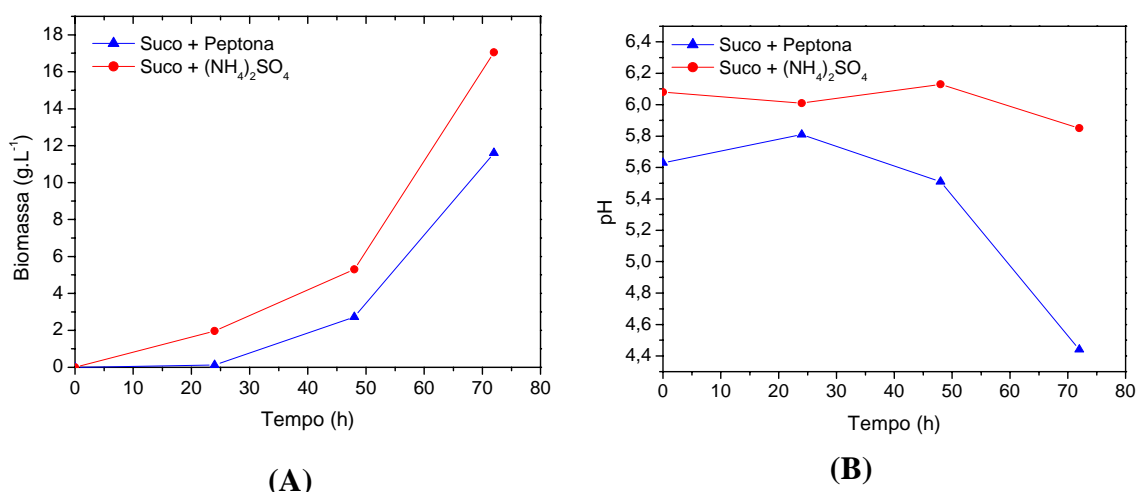


Figura 4.17: Perfil da biomassa (A) e do pH (B) em função do tempo durante a fermentação a 30°C e 150 rpm utilizando *B. subtilis* LAMI007 em diferentes meios de cultivo: (■) suco de caju integral suplementado com peptona e (●) suco de caju integral suplementado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Podemos observar que com a suplementação do suco com fonte de nitrogênio, tanto peptona e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obteve-se um maior crescimento (Figura 4.17) da cepa no

suco de caju. Observa-se ainda que o crescimento do microrganismo foi levemente superior quando houve suplementação do suco com sulfato de amônio, sendo este selecionado para os ensaios subseqüentes.

Quanto ao pH do meio, pode-se observar um comportamento diferente para os dois experimentos (Figura 4.17B). O pH do meio CAJNP apresenta um caráter ácido no final do ensaio, mas o pH do meio CAJN suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ permaneceu praticamente constante ao longo do tempo.

A Tabela 4.9 apresenta a influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007 em suco de caju. Verifica-se que não ocorreu uma redução significativa na tensão superficial, indicando que as condições dos ensaios ou os nutrientes não foram apropriados para possibilitar a produção de biossurfactante.

Tabela 4.9: Influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007 em suco de caju. Meios de cultivo: suco de caju integral (CAJN), suco de caju integral suplementado com peptona (CAJNP), suco de caju integral suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (CAJNNH₄).

Meio de Cultivo	Tensão Superficial Inicial (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após 48 h (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após 72 h (dina.cm ⁻¹)	Redução da TS (%)	
				48 h	72 h
CAJN	44,8	43,8	51,0	2,23	0,00
CAJNP	59,5	58,5	55,5	1,68	6,72
CAJNNH ₄	64,5	56,8	56,8	11,94	11,94

4.3.3. Influência da adição de micro nutrientes ao suco de caju integral na produção de biossurfactantes utilizando *Bacillus subtilis* LAMI007

Segundo Cooper *et al.*, (1981), ferro e manganês são considerados fatores importantes na produção de surfactantes por *Bacillus*. Desta forma, realizou-se um ensaio com *B. subtilis* LAMI007, utilizando: CAJN suplementando com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (CAJNNH₄), sulfato de manganês (0,8 mg.L⁻¹) e sulfato de ferro (6,0 mg.L⁻¹). Os

resultados foram comparados aos obtidos com o meio suco de caju suplementado apenas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ver Figura 4.18 e Tabela 4.10. Observou-se que o meio suplementado com micro-nutrientes (sulfato de manganês e sulfato de ferro) promoveu um maior crescimento da cepa. No entanto, no que diz respeito à produção de biossurfactante, não se observa melhora na produção de biossurfactantes com a adição de manganês e ferro, ao contrário, houve menor redução da tensão superficial após 48 h de cultivo (Tabela 4.10). Ao se adicionar ferro ao no meio CAJNNH₄, ocorreu a formação de um precipitado, cor violeta, que é resultante, provavelmente, da ligação dos íons ferro com os taninos presentes no suco de caju integral. Desta forma, ferro não fica disponível para que o microrganismo o utilize em seu metabolismo para a produção de biossurfactantes.

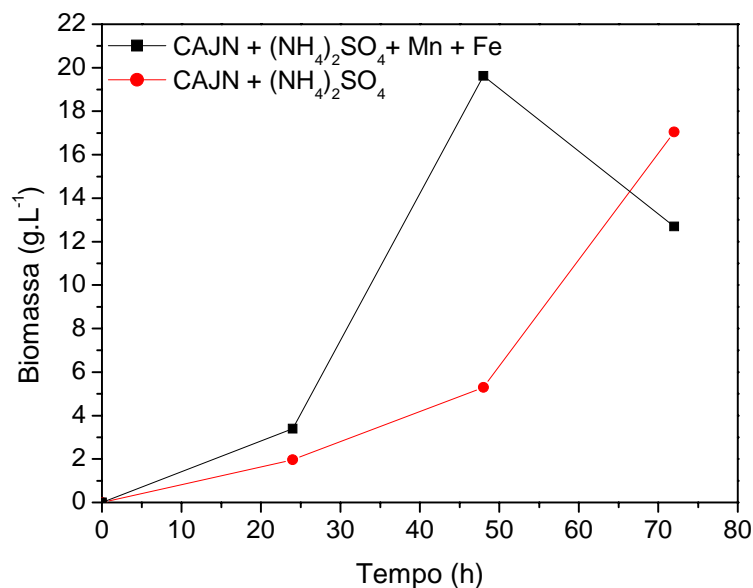


Figura 4.18: Perfil da biomassa em função do tempo durante a fermentação a 30°C e 150 rpm utilizando *B. subtilis* LAMI007 em diferentes meios de cultivo: (●) suco de caju suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e (■) suco de caju suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, manganês e ferro.

Tabela 4.10: Efeito da adição de micro nutriente na produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007 no meio de cultivo CAJNNH₄.

Meio de Cultivo	Tensão Superficial Inicial (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após 48 h (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após 72 h (dina.cm ⁻¹)	Redução da TS (%)	
				48 h	72 h
CAJNNH ₄	64,5	56,8	56,8	11,94	11,94
CAJNNH ₄ + Mn + Fe	61,0	59,5	54,5	2,45	10,66

4.3.4. Avaliação da produção de biossurfactante por fermentação em meio mineral e suco de caju clarificado (CAJC) por *Bacillus subtilis* LAMI007

Face às dificuldades encontradas na produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007 utilizando o suco de caju integral, decidiu-se por estudar uma nova formulação para o meio de cultivo: uma mistura do meio mineral com suco de caju clarificado (CAJC). Para efeito de comparação, realizaram-se ensaios adicionando-se ao meio mineral concentrações conhecidas de glicose, frutose e sacarose.

Inicialmente, estudaram-se baixas concentrações de glicose provenientes do CAJC, a saber: 0,25, 0,50 e 1,00 g.L⁻¹. A Figura 4.19 mostra o perfil de crescimento da bactéria estudada para as diferentes concentrações avaliadas. Observou-se que, até 24 horas de fermentação, houve crescimento celular, para todas as concentrações estudadas. A partir deste tempo, ocorreu morte celular ($2,3 \times 10^1$ UFC.mL⁻¹ no meio com 1,00 g.L⁻¹), devido, provavelmente, à escassez da fonte de carbono.

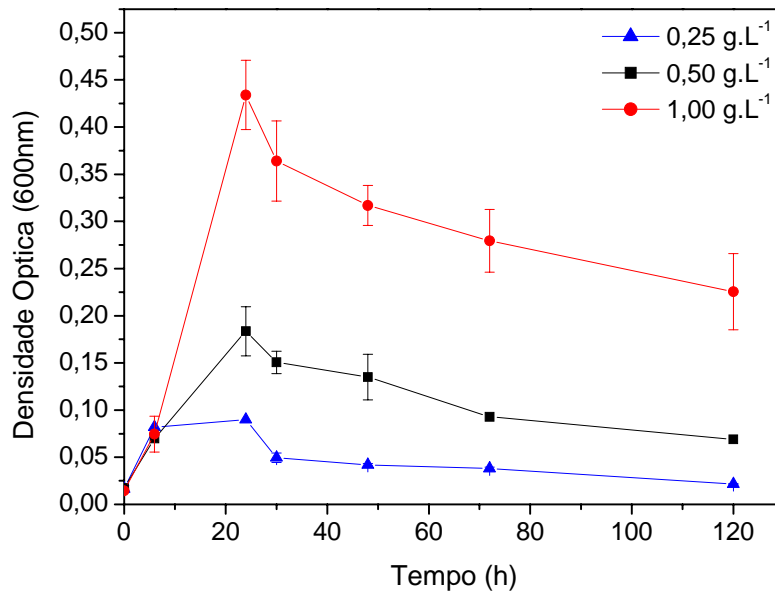


Figura 4.19: Perfil de biomassa durante a fermentação por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral formulado com diferentes concentrações de glicose proveniente do suco de caju: 0,25, 0,50 e 1,00 g L⁻¹.

A seguir, optou-se por aumentar a concentração de glicose presente no meio de cultivo para 10 g.L⁻¹. As Figuras 4.20 e 4.21 e a Tabela 4.11 mostram o crescimento celular, concentração de substrato e tensão superficial, respectivamente, para os meios formulados com suco de caju e reagentes PA, na ausência de extrato de levedura. Um maior crescimento celular ocorreu no meio contendo CAJC, causado provavelmente devido ao consumo de frutose presente no suco de caju. O microrganismo consumiu simultaneamente os açúcares (glicose e frutose) presentes no meio formulado com suco de caju (Figura 4.21).

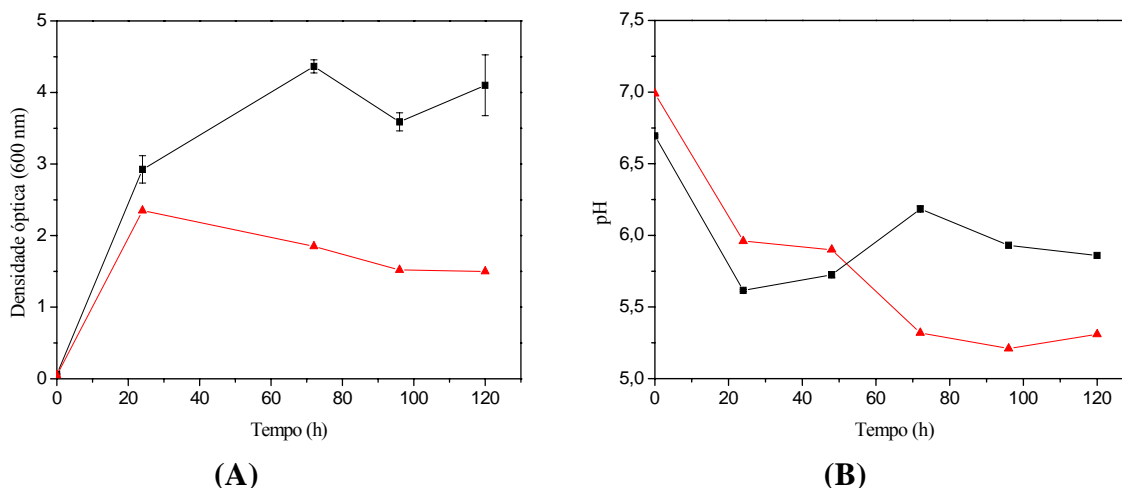


Figura 4.20: Perfil da biomassa (A) e do pH (B) ao longo do tempo de fermentação de *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral com: (■) suco de caju clarificado – CAJC e (▲) glicose P.A. (controle) a 30°C e 180 rpm.

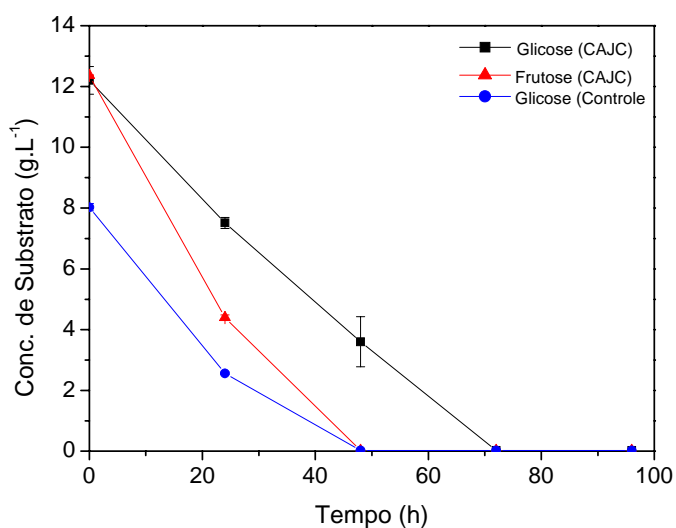


Figura 4.21: Consumo de substrato durante fermentação por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral formulado com CAJC e com glicose P.A. (controle) a 30°C e 180 rpm.

Não ocorreu uma redução significativa na tensão superficial ao longo do tempo de cultivo, para nenhum dos meios estudados (Tabela 4.11). No entanto, apesar da pouca redução da tensão superficial do meio fermentado livre de células, foi possível extrair surfactina, que foi detectada através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 4.11: Produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral formulado com suco de caju (MM-CAJC) e com glicose P.A. a 180 rpm e 30°C.

Tempo de Cultivo (Horas)	Tensão Superficial (dina.cm ⁻¹)	
	MM-CAJC	Controle
0	52,92 ± 0,46	56,50 ± 0,58
24	60,45 ± 0,51	56,72 ± 0,52
48	58,08 ± 0,54	55,68 ± 0,50
72	58,00 ± 0,44	58,75 ± 0,50
96	60,12 ± 0,55	52,88 ± 0,15

A Figura 4.22 mostra um cromatograma obtido da análise de surfactina produzida em meio MM-CAJC por cromatografia, comparando resultados de uma amostra de biossurfactante (bruto e purificado) com um padrão de surfactina. O tempo de retenção das amostras é o mesmo do padrão, o que comprova que houve produção de surfactina durante a fermentação. No entanto, a concentração de surfactina no meio livre de células não foi suficiente para reduzir a tensão superficial do meio de cultivo a valores na faixa esperada, entre 25 e 35 dina.cm⁻¹. Conforme Cooper e Zajic (1980), a concentração micelar crítica (CMC) da surfactina em água é de 25 mg.L⁻¹ e a tensão superficial atinge níveis de 25 dina.cm⁻¹.

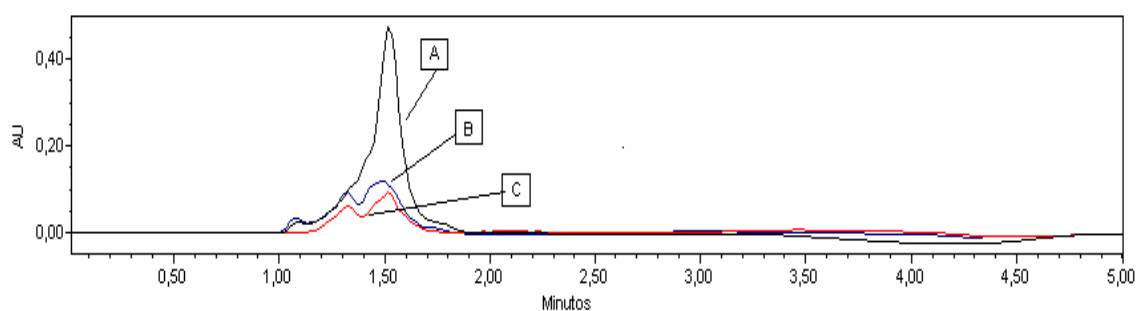


Figura 4.22: Cromatograma das análises da surfactina, realizadas por cromatografia, com a coluna Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm, Water, Irlanda) e a fase móvel de 20 % de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ a temperatura ambiente. (A) Surfactina bruta obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio MM-CAJC. (B) Surfactina purificada obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio MM-CAJC. (C) Surfactina padrão – Sigma (0,2 mg.L⁻¹).

4.3.5. Avaliação da influência de extrato de levedura na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI007 usando meio mineral formulado com suco de caju clarificado

Morán *et al.* (2000) utilizaram extrato de levedura na composição do meio para produzir surfactina para aplicação em biodegradação de hidrocarbonetos, obtendo resultados satisfatórios na degradação de alcanos. Reis *et al.* (2004) avaliaram a influência de extrato de levedura, EDTA e solução de micro nutrientes na produção de surfactantes lipopeptídeos por *B. subtilis* em material de baixo custo, obtendo maior biomassa no ensaio com extrato de levedura, no entanto, não se observou a influência na produção de biossurfactante, acompanhada através da redução na tensão superficial. Fox e Bala (2000) verificaram que a adição de extrato de levedura em meio alternativo usando batata como substrato, estimulou o crescimento da cepa *B. subtilis*, porém não favoreceu o decréscimo na tensão superficial. A adição de extrato de levedura estimula o crescimento celular devido o complexo de vitaminas B, que são necessárias à formação de enzimas, coenzimas, aminoácidos e outros componentes estimulantes do crescimento microbiano.

Como as informações presentes na literatura a respeito do uso de extrato de levedura para a produção de surfactina são contraditórias, realizaram-se estudos para se verificar sua influência na produção de biossurfactante. A Figura 4.23 mostra os resultados do crescimento do *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral contendo extrato de levedura (5 g.L^{-1}) e diferentes fontes de carbono, na concentração de 10 g.L^{-1} : glicose (PA), suco de caju clarificado (CAJC) e sacarose. Verificou-se na Figura 4.23A que a cultura atingiu a fase estacionária após 24 horas de cultivo, quando glicose e sacarose PA foram utilizadas como fonte de carbono. Este tempo coincide com uma brusca diminuição na concentração dos substratos (Figura 4.24). Para o meio mineral formulado com suco de caju clarificado (MM-CAJC), a cultura de *B. subtilis* LAMI007 atingiu a fase estacionária após 48 horas de ensaio (maiores valores de densidade óptica), devido provavelmente a maior concentração de açúcares presentes no meio (Figura 4.23A).

Em todos os casos estudados, houve uma diminuição do pH do meio, que permaneceu entre 5,8 e 5,9 (Figura 4.23B). Como a surfactina precipita em valores

ácidos de pH, faz-se necessário acompanhar esta variável. Fox e Bala (2000) observaram o aumento do pH do meio durante o cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332, usando batata como substrato sem a presença de tampões, atingindo valores de pH na faixa de 6,2 a 8,5. Reis *et al.* (2004) reportaram o mesmo comportamento na produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 6633 utilizando material de baixo custo (açúcar comercial, cana de açúcar, óleo de soja e outros).

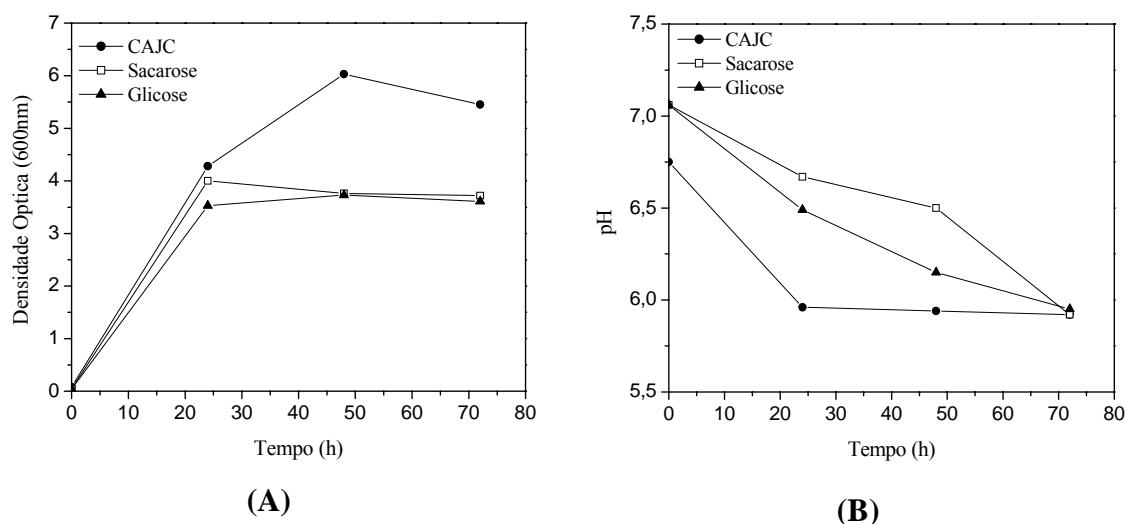


Figura 4.23: Perfil da biomassa (A) e pH (B) durante fermentação por *B. subtilis* LAMI007, a 30°C e 180 rpm, em meio mineral suplementado com extrato de levedura, usando os meios: (●) MM-CAJC, (▲) glicose PA e (□) sacarose PA como fonte de carbono.

A Figura 4.24 apresenta o consumo de substrato (glicose e frutose) durante a fermentação do meio mineral formulado com CAJC e com glicose PA (controle). Comparando-se as Figuras 4.23A e 4.24, verificou-se que o início da fase estacionária coincide com uma concentração muito baixa de substrato no meio de cultivo.

A cepa do *B. subtilis* LAMI007 estudada consumiu todas as fontes de carbono utilizadas: glicose e frutose, presentes no CAJC, bem como glicose e sacarose, reagentes P.A. Nitschke e Pastore (2006) observaram, no início do cultivo, um aumento na concentração de glicose e frutose quando sacarose foi utilizada como fonte de carbono. Nos ensaios realizados neste trabalho, não se observou a formação de glicose e

frutose no meio, indicando que a sacarose foi consumida imediatamente. Todas as fontes de carbono foram consumidas até 48 horas de cultivo e a bactéria consome mais rapidamente frutose e sacarose.

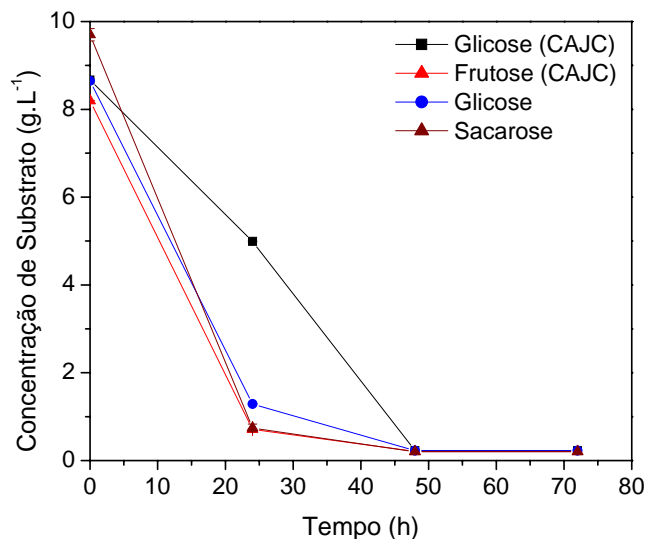


Figura 4.24: Consumo de substrato durante a fermentação para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007, a 30°C e 180 rpm, em meio mineral suplementado com extrato de levedura (5 g.L⁻¹) e formulado com: CAJC ((■)glicose e (▲)frutose); (▲) sacarose e (●) glicose como fonte de carbono.

A Tabela 4.12 apresenta a produção de biossurfactante em meio mineral, contendo ou não extrato de levedura, formulado com diferentes fontes de carbono. Todas as fontes de carbono testadas favoreceram a produção extracelular do biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007, a qual foi estimada através da redução da tensão superficial do meio de cultivo fermentado livre de células. Estes resultados demonstraram que o suco de caju se mostra como uma fonte de carbono alternativa capaz de suportar o crescimento microbiano e a biossíntese de biossurfactante.

A menor tensão superficial no meio contendo CAJC ou glicose foi obtida com 24 horas de cultivo, quando houve suplementação com extrato de levedura. Este período coincide com uma diminuição na concentração de açúcares e o início da fase estacionária de crescimento. Sheppard e Mulligan (1987) relataram que a produção de

surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 ocorria principalmente a partir do final da fase exponencial de crescimento, resultado similar ao observado neste trabalho. Contudo, Kim *et al.* (1997) observaram uma relação direta entre crescimento celular, produção de biossurfactante e consumo de carboidratos quando *B. subtilis* C9 era cultivado em meio sintético.

Tabela 4.12: Efeito da presença de extrato de levedura e de diferentes fontes de carbono na produção de biossurfactante por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral.

Fonte de Carbono	Extrato de Levedura (g.L ⁻¹)	Tensão Superficial Inicial (dina.cm ⁻¹)	Tensão Superficial após cultivo (dina.cm ⁻¹)	Redução da Tensão Superficial (%)
CAJC	0,0	60,45 ± 0,00	60,45 ± 0,00	0,00
Glicose	0,0	56,50 ± 0,58	56,72 ± 0,53 ⁱ	0,00
CAJC	5,0	50,30 ± 0,24	39,55 ± 0,45 ⁱ	21,37
Glicose	5,0	58,00 ± 0,00	44,00 ± 0,00 ⁱ	24,14
Frutose	5,0	57,33 ± 0,58	43,67 ± 0,58 ⁱⁱ	23,82
Sacarose	5,0	58,95 ± 0,10	38,10 ± 0,81 ⁱⁱ	35,37

(i) Com 24 horas de cultivo e (ii) Com 48 horas de cultivo.

Não ocorreu redução na tensão superficial nos ensaios sem a suplementação de extrato de levedura, usando as fontes de carbono: suco de caju e glicose (Tabela 4.12). Todavia, ao se utilizar extrato de levedura, obteve-se uma redução expressiva na tensão superficial. Este resultado é contraditório com o obtido por Fox e Bala (2000) e Reis *et al.* (2004), porém as cepas de *B. subtilis* utilizadas em seus estudos foram ATCC 21332 e ATCC 6633, respectivamente, diferentes da cepa estudada neste trabalho.

A menor tensão superficial do meio livre de células foi obtida quando sacarose foi utilizada como fonte de carbono, uma redução de 58,95 a 38,10 dina cm⁻¹, ou seja, de 35,37 %. Makkar e Cameotra (1997) comparam biomassa e produção de biossurfactante produzido por *B. subtilis* MTCC 2423 cultivados em diferentes fontes de carbono (solúveis e insolúveis). A maior quantidade de biomassa obtida por esses autores foi com os substratos sacarose e hexadecano, 2,6 e 2,4 g.L⁻¹, respectivamente.

Ao utilizar glicose, observou-se um crescimento de apenas 1,85 de g-células.L⁻¹. Ressalta-se, porém que a tensão superficial do meio após 24 horas de cultivo utilizando CAJC foi de 39,55 dina cm⁻¹, valor próximo ao obtido quando se utilizou sacarose.

Comparado com os resultados de literatura, houve baixa produtividade de surfactina, que pode ter sido causada pela formação de protease durante o ensaio fermentativo. Tem-se conhecimento que microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* são capazes de produzir proteases (Anwar e Saleemudin, 1998). Então, a baixa produção de surfactina provavelmente pode estar relacionada à ação enzimática. Segundo Grangemard *et al.* (1999), a enzima atua sobre a porção peptídica do surfactante, gerando um lipopeptídeo de cadeia aberta.

A Figura 4.25 apresenta um cromatograma da análise da surfactina extraída da fermentação de meio mineral suplementado com extrato de levedura. Comparando as alturas dos picos (A e B, na Figura 4.25), verificou-se que há uma perda considerável na extração com solvente.

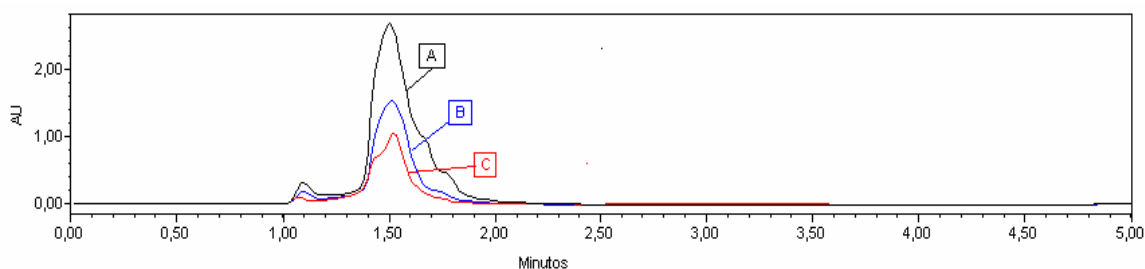


Figura 4.25: Cromatograma das análises da surfactina. Coluna Symmetry C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm, Water, Irlanda) e a fase móvel de 20 % de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila na vazão de 1 mL.min⁻¹ e temperatura ambiente. (A) Surfactina bruta obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio de cultivo MM-CAJC suplementado com extrato de levedura (5 g.L⁻¹). (B) Surfactina purificada obtida da fermentação com *B. subtilis* LAMI007 usando o meio de cultivo MM-CAJC suplementado com extrato de levedura (5 g.L⁻¹). (C) Surfactina padrão (0,2 mg.mL⁻¹).

Quando se utilizou meio mineral suplementado com extrato de levedura e CAJC (como fonte de carbono), obteve-se uma concentração de surfactina de $3,49 \pm 8 \times 10^{-3}$

mg.L⁻¹ de meio de cultura. Este resultado ressalta que o suco de caju apresenta-se como um bom substrato para produção de surfactina.

A Figura 4.26 apresenta o Índice de Emulsificação do querosene pelo biossurfactante produzido por fermentação de meio mineral contendo extrato de levedura e CAJC como fonte de carbono, a 30°C. Com 72 horas de cultivo, conseguiu-se atingir 65 % de emulsificação do querosene, indicando que o produto da fermentação tem a ação emulsificante.

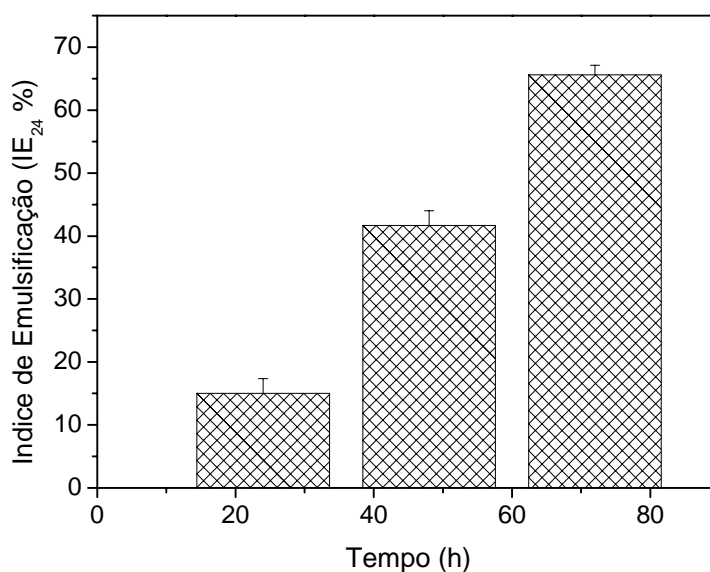


Figura 4.26: Índice de Emulsificação (IE₂₄%) do querosene pelo biossurfactante produzido por fermentação de meio mineral contendo extrato de levedura e CAJC como fonte de carbono, a 30°C utilizando *B. subtilis* LAMI007.

4.3.6. Caracterização preliminar do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI007

A caracterização preliminar por cromatografia de camada delgada revelou que o biossurfactante de *B. subtilis* LAMI007 produzido em meio mineral com CAJC suplementado com extrato de levedura apresentou uma pequena mancha com fator de retenção (R_f) de 0,52, enquanto o padrão de surfactina (Sigma) apresentou uma mancha

com R_f de 0,54. Observou-se, também, uma pequena mancha que não se encontra no padrão, provavelmente se deve à presença de impurezas.

A Figura 4.27 mostra o espectro infravermelho de uma amostra de surfactina comercial, aqui denominada padrão. Observaram-se bandas características de peptídeos a 3298 cm^{-1} (A) resultante do estiramento da ligação O-H e N-H. (B) e (C) representam as bandas de absorção nas frequências de 2800 a 2950 cm^{-1} que se deve a deformação axial de C-H; $\nu_{\text{as}}\text{ CH}_3$, $\nu_{\text{as}}\text{ CH}_2$. A banda em 1734 cm^{-1} (D) refere-se à absorção de grupo carbonil de anel lactona. Em 1652 cm^{-1} (E) verificou-se o estiramento da ligação C=O e as bandas (F) e (G) representam a deformação angular (δ) no plano das ligações de C-H, enquanto que as bandas (H) e (I) apresentam a deformação angular (δ) simétrica fora do plano das ligações C-H. Estes resultados indicaram que a surfactina contém cadeia alifática bem como uma porção peptídica.

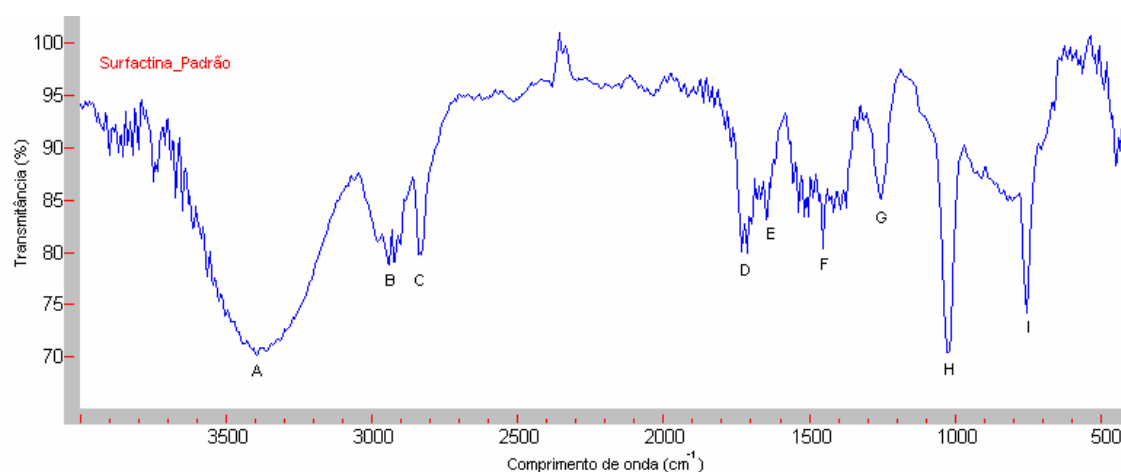


Figura 4.27: Espectro infravermelho de uma amostra comercial de surfactina produzido por *B. subtilis*.

A Figura 4.28 mostra o espectro infravermelho da surfactina obtida da fermentação usando meio mineral com CAJC suplementado com extrato de levedura por *B. subtilis* LAMI007. No entanto, o espectro não apresentou boa resolução, ocorrendo extrapolação de várias bandas. Tal fato pode ter ocorrido devido ao preparo incorreto da amostra, por exemplo, necessitando de um tempo maior de secagem, ou conduzir uma purificação por cromatografia de adsorção com sílica gel 60 (Nitschke, 2004).

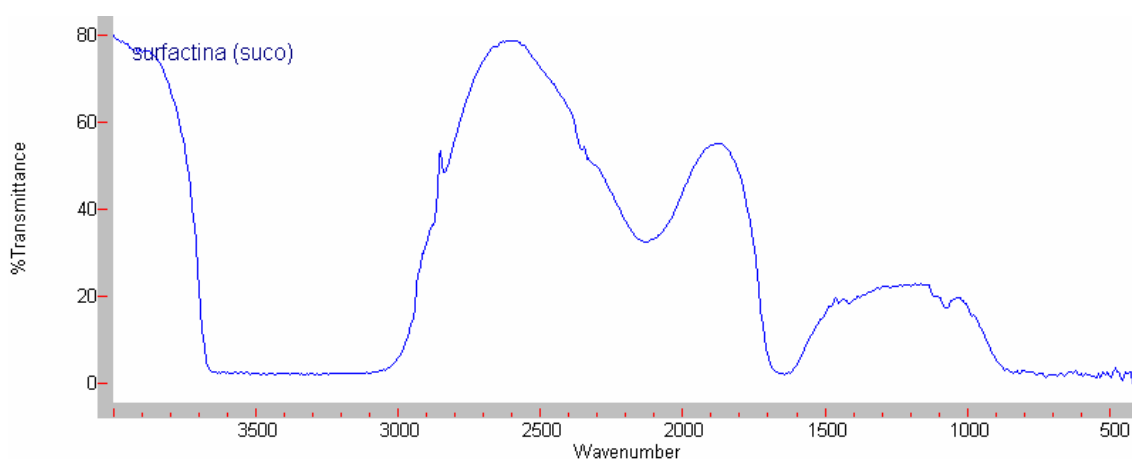


Figura 4.28: Espectro infravermelho da surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI007 em meio mineral com CAJC suplementado com extrato de levedura.

4.3.7. Seleção de cepas de *Bacillus* com maior potencial de produção de biossurfactantes utilizando Suco de Caju Clarificado como matéria-prima

Devido à baixa produtividade obtida com a cepa de *B. subtilis* LAMI007 inicialmente selecionada, avaliou-se diferentes cepas de *Bacillus* isoladas da Estação de tratamento de efluentes da Universidade Federal do Ceará. A Tabela 4.13 mostra os resultados de tensão superficial obtidos para as diferentes cepas avaliadas.

Conforme observado na Tabela 4.13, as cepas de *Bacillus* que melhor apresentaram potencial produtor de biossurfactante no meio estudado foram: LAMI001, LAMI002, LAMI004, LAMI005 e LAMI008, com maiores reduções da tensão superficial após 48 horas de cultivo. A Figura 4.29 apresenta o gráfico do intervalo de confiança do *screening* para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus* isoladas, com confiança de 95 %. Não há evidência estatística, com confiança de 95 %, que os *Bacillus* LAMI001, 002, 004, 005 e 008 sejam diferentes entre si (Figura 4.29). Por outro lado, a cepa BE 03 apresentou o pior resultado, não havendo evidência estatística que este seja diferente dos *Bacillus* LAMI006 e 009, como também, é estaticamente diferente, em termos de resultados médios, com nível de significância de 5 %, aos demais, exceto das cepas LAMI006 e 009.

Tabela 4.13: Avaliação da produção de biossurfactantes por cepas de *Bacillus* isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará. Comparação da tensão superficial obtida após 48 horas de cultivo em meio mineral contendo 10 g.L⁻¹ de glicose proveniente do CAJC, a 180 rpm e 30°C.

Microrganismo	Tensão Superficial após 48 h (dina.cm ⁻¹)			
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média
LAMI001	29,5 ± 0,0	30,0 ± 0,0	-	29,8 ± 0,4
LAMI002	29,5 ± 0,0	29,5 ± 0,0	29,5 ± 0,0	29,5 ± 0,0
LAMI003	56,4 ± 0,9	-	54,0 ± 0,8	55,2 ± 1,7
LAMI004	32,0 ± 0,0	31,8 ± 0,3	-	31,9 ± 0,1
LAMI005	32,1 ± 0,2	-	31,7 ± 0,3	31,9 ± 0,3
LAMI006	-	44,8 ± 1,0	58,4 ± 4,0	51,6 ± 9,6
LAMI007	-	43,6 ± 1,3	46,0 ± 0,8	44,8 ± 1,7
LAMI008	30,0 ± 0,0	28,3 ± 0,3	28,0 ± 0,0	28,8 ± 1,0
LAMI009	49,4 ± 1,8	-	50,2 ± 2,2	49,8 ± 0,6
LAMI010	42,4 ± 0,8	42,1 ± 2,0	45,9 ± 2,2	43,5 ± 2,1
LAMI011	44,1 ± 1,2	46,5 ± 0,0	49,0 ± 2,3	46,5 ± 2,4
LAMI012	38,5 ± 0,6	38,6 ± 1,1	-	38,5 ± 0,1

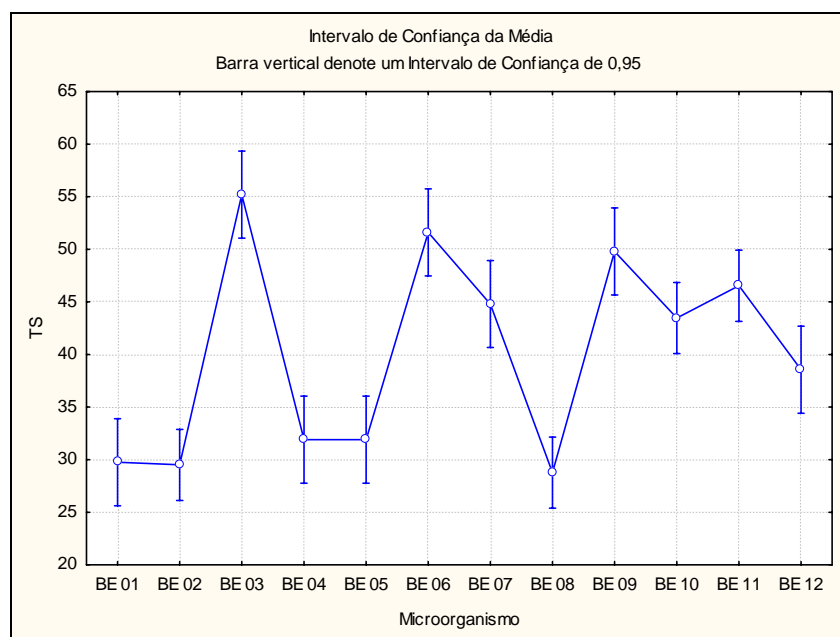


Figura 4.29: Gráfico do intervalo de confiança do *screening* para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus* isoladas.

A análise de variância (ANOVA), com Teste F e o nível de significância de 5%, e dados das análises estatísticas do *screening* para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus* isoladas encontram-se nas Tabelas 4.14 e 4.15, respectivamente.

Tabela 4.14: Tabela de Análise de Variância (ANOVA) para o *screening* de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus*.

	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Teste F	Significância p
Intercept	43518,59	1	43518,59	5705,017	0,000000
Microorganismo	2317,15	11	210,65	27,615	0,000000
Erro Puro	122,05	16	7,63		
Total	2439,20	27			

Tabela 4.15: Dados das análises estatísticas do *screening* para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus* isoladas.

Microorganismo	N	Média	Desvio Padrão	Desv Pad. Erro	Intervalo de Confiança	
					TS -95,00%	TS +95,00%
	28	39,70714	9,504772	1,796233	36,0216	43,3927
LAMI001	2	29,75000	0,353553	0,250000	26,5734	32,9266
LAMI002	3	29,50000	0,000000	0,000000	29,5000	29,5000
LAMI003	2	55,20000	1,697056	1,200000	39,9526	70,4474
LAMI004	2	31,90000	0,141421	0,100000	30,6294	33,1706
LAMI005	2	31,90000	0,282843	0,200000	29,3588	34,4412
LAMI006	2	51,60000	9,616652	6,800000	-34,8022	138,0022
LAMI007	2	44,80000	1,697056	1,200000	29,5526	60,0474
LAMI008	3	28,76667	1,078579	0,622718	26,0873	31,4460
LAMI009	2	49,80000	0,565685	0,400000	44,7175	54,8825
LAMI010	3	43,46667	2,112660	1,219745	38,2185	48,7148
LAMI011	3	46,53333	2,450170	1,414606	40,4468	52,6199
LAMI012	2	38,55000	0,070711	0,050000	37,9147	39,1853

Observando o histograma dos desvios (Figura 4.30), tendo com variável dependente a tensão superficial, verificou-se que os dados são aleatórios e independentes, não apresentando vícios ou manipulação.

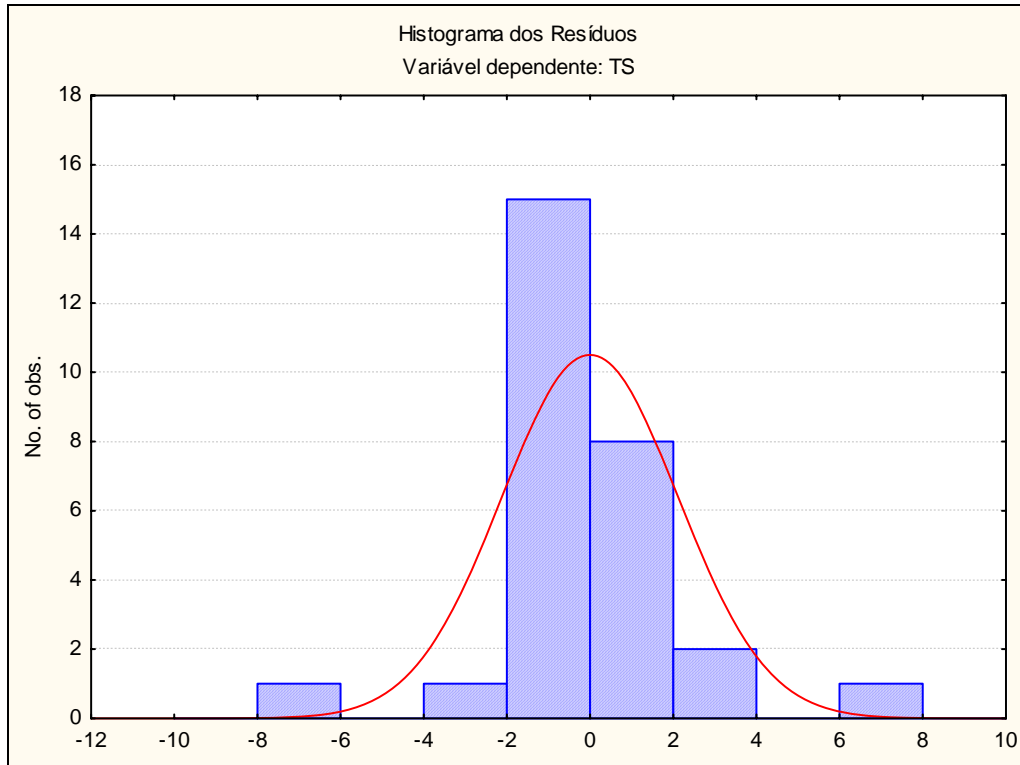


Figura 4.30: Histograma dos Resíduos do *screening* para avaliar o potencial de produção de biossurfactante por diferentes cepas de *Bacillus* isoladas.

Avaliou-se ainda a atividade emulsificante do produto de fermentação das 12 cepas de *Bacillus* utilizando querosene e gasolina. A Tabela 4.16 mostra os resultados obtidos.

Tabela 4.16: Avaliação da atividade de emulsificação de gasolina e querosene dos produtos de fermentação das cepas de *Bacillus* isoladas da ETE do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, após 48 horas de cultivo em meio mineral contendo 10 g.L⁻¹ de glicose proveniente do CAJC e 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, a 180 rpm e 30°C.

Microrganismo	Querosene	Gasolina
LAMI001	Sim	Não
LAMI002	Sim	Sim
LAMI003	Não	Não
LAMI004	Sim	Sim
LAMI005	Não	Não
LAMI006	Não	Não
LAMI007	Sim	Sim
LAMI008	Sim	Não
LAMI009	Não	Não
LAMI010	Não	Sim
LAMI011	Não	Não
LAMI012	Não	Sim

As Figuras 4.31 e 4.32 apresentam fotos da atividade emulsificante do biossurfactante produzido pelas cepas de *Bacillus* frente a querosene e gasolina, respectivamente. Deve-se destacar o potencial da cepa LAMI002 e LAMI004 que promoveram a emulsificação dos dois hidrocarbonetos, bem como promoveram a redução da tensão superficial do meio livre de células, $29,5 \pm 0,0$ e $31,9 \pm 0,1$ dina.cm⁻¹, respectivamente. A cepa LAMI008 promoveu redução da tensão superficial do meio livre de célula, atingindo $28,8$ dina.cm⁻¹, porém o biossurfactante produzido foi capaz de emulsificar apenas querosene.

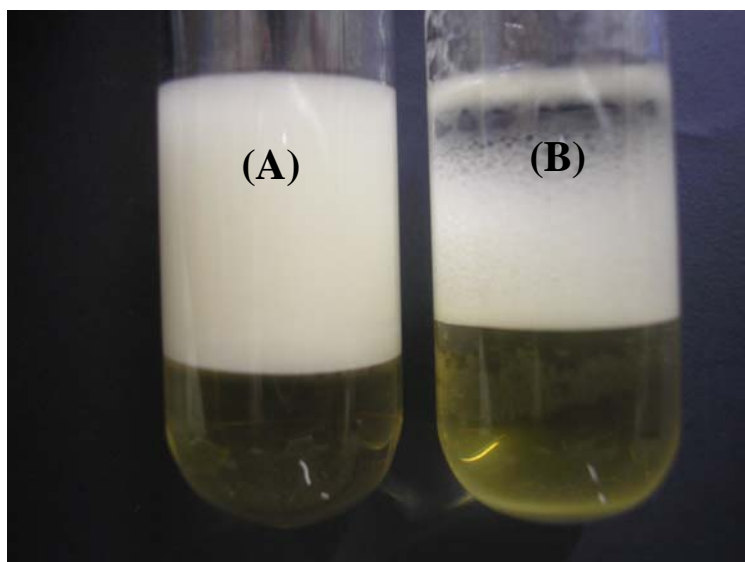


Figura 4.31: Emulsificação de querosene pelas cepas de *Bacillus*: (A) LAMI002 e (B) LAMI008.

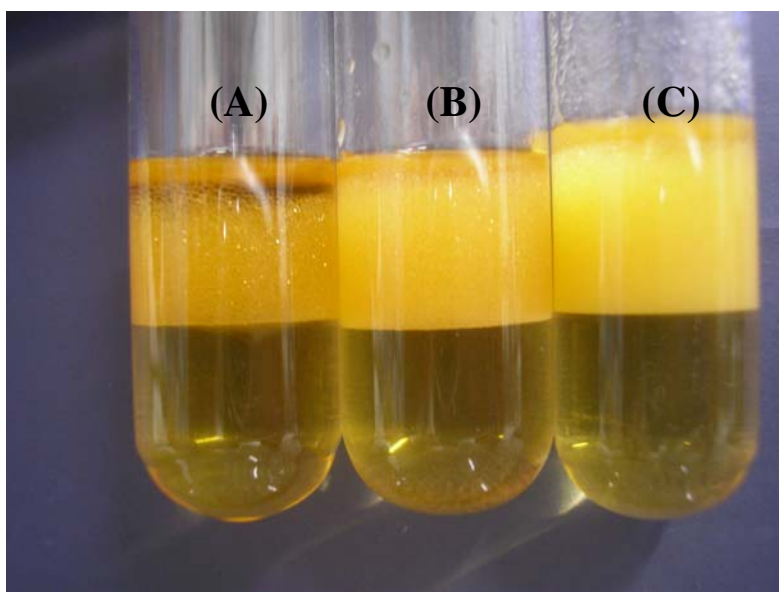


Figura 4.32: Emulsificação de gasolina pelas cepas de *Bacillus*: (A) LAMI012; (B) LAMI007 e (C) LAMI010.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, o suco de caju pode ser utilizado como substrato para o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sendo que a adição de fontes de nitrogênio, como por exemplo, peptona e NaNO_3 , proporcionaram resultados mais satisfatórios. Além disso, a utilização do suco de caju como meio de cultivo não resultará apenas redução no custo da produção de biossurfactantes, mas também trará uma finalidade a um material que geralmente fica no chão dos locais de colheita e contribui à poluição ambiental.

Todos os sais inorgânicos (NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e peptona serviram como fonte de nitrogênio para a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* ATCC 10145. A maior redução na tensão superficial (41 %) foi obtida no suco de caju suplementado com peptona (CAJNP) após 24h de cultivo, com redução na tensão superficial de 50 para $29,5 \text{ dina.cm}^{-1}$. O biossurfactantes foi detectado no meio CAJNP após 24 h de cultivo, porém nos meios suplementados com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou NaNO_3 , a maior produção ocorreu após 72 h de fermentação. Em relação ao consumo dos açúcares presentes no suco, observou-se que *P. aeruginosa* ATCC 10145 consumiu preferencialmente glicose.

Em relação ao pH do meio de cultivo, observou-se, durante os ensaios fermentativos, que o pH tornou-se ácido ao utilizar os meios CAJN, CAJNP, CAJNNH₄. Quando se utilizou caldo nutritivo ou o meio CAJNaNO₃, observou-se um caráter básico.

Os hidrocarbonetos: hexano, heptano, gasolina e querosene, e óleo de soja foram emulsionados pelo biossurfactantes. O maior índice de emulsificação foi obtido com óleo de soja (71,79 % de emulsificação), enquanto o menor índice foi com querosene (16,50 % de emulsificação).

Nenhuma proteína foi detectada no biossurfactantes produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em CAJNP, no entanto, continha carboidratos.

Com base nos estudos da estabilidade do biossurfactantes produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju suplementado com peptona, verificou-se que o produto de interesse pode ser aplicado na biorremediação, em ambientes com alta salinidade, temperatura e pH como, por exemplo, em derramamento de petróleo e seus derivados em mares ou solos. Através da análise de ANOVA, com nível de significância de 5 %, não ocorreu mudança na atividade surfactante do biossurfactante produzido nas concentrações de NaCl avaliadas, nos intervalos de pH estudados e nos tempos de exposição a temperaturas de 100°C e 121°C por 15 min.

Na avaliação do crescimento do *Bacillus subtilis* LAMI007 em suco de caju integral, verificou-se que não ocorria crescimento do microrganismo quando baixas concentrações de glicose e frutose foram utilizadas. Com o aumento da concentração destas fontes de carbono, ocorreu crescimento celular, porém somente quando houve suplementação do meio com fonte de nitrogênio. No entanto, não houve produção de biossurfactante, acompanhada através da diminuição da tensão superficial do meio de cultura. A utilizar meio mineral com diferentes fontes de carbono: suco de caju clarificado (MM-CAJC), glicose, frutose e sacarose obtiveram-se crescimento celular e produção de biossurfactante. Análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, mostraram que houve produção de surfactina. Contudo, mesmo após a otimização do meio de cultura, não se obteve resultados satisfatórios de tensão superficial, quando comparados a valores relatados em literatura. A mínima tensão alcançada nos experimentos foi superior a 35 dina.cm⁻¹, quando é sabido que tensões de 27 a 29 dina.cm⁻¹ podem ser alcançadas com o biossurfactantes produzido por *B. subtilis* (Nistchke e Pastore, 2002). Desta forma, fez-se uma avaliação de outras doze cepas de *Bacillus* isoladas da estação de tratamento da Universidade Federal do Ceará. Os *Bacillus* LAMI001, LAMI002, LAMI004, LAMI005 e LAMI008 apresentaram maior potencial produtor de biossurfactante em meio mineral com CAJC e extrato de levedura. Com a cepa LAMI008, obteve-se uma tensão superficial de 28,8 ± 1,0 dina.cm⁻¹ com 48 horas de cultivo a 30°C e 180 rpm.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando-se os resultados aqui apresentados, sugere-se:

1. Caracterizar o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em meio CAJNP.
2. Avaliar o potencial para a biorremediação do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em meio CAJNP.
3. Otimizar a produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* em biorreator de 5 L, como também estudar a influência da aeração na produção de biossurfactantes.
4. Caracterizar o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI007 em meio MM-CAJC.
5. Estuda a estabilidade da surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI007 em meio MM-CAJC, frente a variações de temperatura, pH e concentrações salinas.
6. Calcular a atividade da protease que poderá estar influenciando na produção de surfactina por *B. subtilis* LAMI007.
7. Estudar a atividade antimicrobiana e antiviral da surfactina produzida por *B. subtilis* LAMI007.
8. Estudar a cinética de crescimento das cepas de *Bacillus* LAMI001, LAMI002, LAMI004, LAMI005 e LAMI008 e produção de biossurfactantes em meios de cultivo utilizando como fonte de carbono suco de caju clarificado. Como também, separar e caracterizar estes biossurfactantes.
9. Com a cepa, citadas anteriormente, que apresentar maior potencial produtor de surfactina, avaliar a produção deste biossurfactante em biorreator de 5 L.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINWALE, T. O. **Cashew apple juice: its use in fortifying the nutritional quality of some tropical fruits.** Eur. Food Res. Technol., v. 211, p. 205-207, 2000.

ANWAR, A.; SALEEMUNDIN, M. **Alkaline proteases: a review.** Bioresource Technology, v. 64, p. 175-183, 1998.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. **Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation.** Biochem Biophys Res Commun 31, p. 488-494, 1968.

ATLAS, R. M. **Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: bioremediation of oil spills.** J. Chem. Technol. Biotechnol., v. 52, n. 2, p. 149-156, 1991.

ASSUNÇÃO, R. B., MERCADANTE, A. Z. **Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.).** J. Food Composition Anal., 16, 647-657, 2003.

BABU, P. S.; VAYDI, A. N.; BAL, A. S.; KAPUR, R.; JUWARKAR, A.; KHANNA, P. **Kinetic of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes.** Biotechnol. Lett. 18, p. 263-268, 1996.

BAETHGEN W. E. E ALLEY M. M. A. **Manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digestin.** Commun in Soil Sei Plant Anal. v. 20, n. 9 e 10, p. 961-969, 1989.

BANAT, I. M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S. **Biosurfactant production and use in oil tank tank clean-up.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 7, p. 80-88, 1991.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **Potential commercial applications of microbial surfactants.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT, I. M. **Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review.** Bioresource Technol. v. 51, p. 1-12, 1995.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, A.; MORAES, I. O. **Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source.** J Food Eng. v. 54, p. 283-288, 2002.

BOGNOLO, G. **Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons.** Colloids Surf. A. v. 152, p. 41-52. 1999.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,** Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. **Synthesis of biosurfactants in extreme conditions.** Appl Microbiol Biotechnol. v. 50, p. 520-529, 1998.

CAMPOS, D. C. P.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; COURI, S. **Cashew apple juice stabilization by microfiltration.** Desalination., v. 148, p. 61–65, 2002.

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

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

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

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. **Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils.** Process Biochemistry, v. 41, p. 483-488, 2006.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. **Biorremediação: Tratamento para Derrames de Petróleo.** Ciência Hoje, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.

DAMASCENO, S. **Cultivo de *Geotrichum fragrans* em manipueira.** Tese de Doutorado em Agronomia, Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, 1999.

DAMASCENO JÚNIOR, J. A.; BEZERRA, F. C. **Qualidade de Pedúnculo de Cajueiro-Anão Precoce Cultivado Sob Irrigação e Submetido a Diferentes Sistemas de Condução e Espaçamento.** Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP, v. 24, n. 1, p. 258-262, 2002.

DANIELS, L.; LINHARDT, R. J.; BRYAN, B. A.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. **Method for producing rhamnose.** European Patent. 0 282 942, 1988.

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

DESAI, A. J.; PATEL, R. M.; DESAI, J. D. **Advances in production of biosurfactants and their commercial applications.** J. Sci. Ind. Res., v. 53, p. 619-629, 1994.

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

DÉZIEL, E., LÉPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMER, O. A.; VILLEMUR, R. **Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on manitol or naphthalene.** Biochimica et Biophysica Acta., v. 1440, p. 244-252, 1999.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, P. A.; REBERS, P. A.; SMITH, F. **Colorimetric methods for determination of sugar and related substances.** Anal Chemic., v. 28, p. 350-356, 1956.

EZERONE, O. U. **Nutrient utilization profile of *Saccharomyces cerevisiae* from palmwine in tropical fruit fermentation.** Antonie Van Leeuwenhoek, v. 86, p. 235-240, 2004.

FARIA, F. S. E. D. V. **Influência de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração de fermentados de caju (*Anacardium occidentale* L) em diferentes condições de fermentação.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, UFC, Fortaleza, Ceará, p. 99, 1994.

FLASZ, A.; ROCHA, C. A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. **A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925.** Medical Science Research, v. 26, p. 181-185, 1998.

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

GOMES, R. V. **Imobilização de esporos de *Bacillus subtilis* em esfera de quitosana obtida de quitina de camarão para uso na biodegradação de hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 75, 2007.

GRANGEMARD, I.; WALLACH, J.; PEYPOUX, F. **Evidence of surfactin hydrolysis by a bacterial endoprotease.** Biotechnology Letters, v. 21, p. 241-244, 1999.

GREEK, B. F. **Sales of Detergents Growing Despite Recession.** Chemical & Engineering News, v. 69, n. 4, p. 25-52, 1991.

GUERRA-SANTOS, L. H.; KAPPELI, O.; FIECHTER A. ***Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source.** Appl. Environ. Microbiol., v. 48, p. 301–305, 1984.

GUERRA-SANTOS, L. H.; KAPPELI, O.; FIECHTER A. **Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors.** Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 24, p. 443-448, 1986.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MARESA, A. **Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils.** J. Appl. Microbiol., v. 88, p. 379-387. 2000.

HOROWITZ, S.; CURRIE, J. K. **Novel dispersants of silicon carbide and aluminum nitride.** J. Dispersion Sci Technol., v. 11, p. 637-659, 1990.

ILORI, M. O.; AMOBI, A. C.; ODOCHA, A. C. **Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment.** Chemosphere, v. 61, p. 985-992, 2005.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. **Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-parafin (C12, C13 and fractions).** J. Antibiotcs. v. xxiv, n. 12, p. 855-859. 1971.

JACK, T. R. **Microbially enhanced oil recovery.** Biorecovery, v. 1, p. 59-73, 1988.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, J. **A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Am. Chem. Soc., v. 71: p. 4124-4126. 1949.

KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. **Microbial enhanced oil recovery (MEOR). Part I Importance and mechanism of MEOR.** Enzyme Microb Technol., v. 16, p. 170-172, 1994.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. **Functions and potencial application of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers.** J. Biosci. Bioeng., v. 94, n. 3, p. 187-201. 2002.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C.; STECHEY, D; WOOD, J. **The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production.** Journal of American Oil Chemist's Society, v. 61, p. 1735-1743, 1984.

LANG, S.; WAGNER F. **Structure and properties of biosurfactants**, p. 21–47. In N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed.), *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1987.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. **Rhamnose lipds – biosynthesis, microbial production and application potencial**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 51, p. 22-32, 1999.

LIMA LOBATO, A. K. C.; MACEDO, G. R.; MAGALHÃES, M. M. A.; BEZERRA, M. S.; ALMEIDA, A. F.; COSTA, A. S. S. **Estudo cinético da produção de biossurfactante**. Anais in CD-Row of XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química, Natal, Brasil, 2002.

LIN, S. C.; CARSWELL, M. M.; GEORGIU, G. **Continuous production of lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 41, p. 281-285, 1994.

MACEDO, R. C.; RIZZO, A. C. L.; MILLIOLI, V. S. **Uso de Biosurfatante no Tratamento, em Biorreator, de Solo Contaminado por Óleo Cru**. Relatório de Atividades Apresentado na XI Jornada de Iniciação Científica – CETEM/MCT, p. 1-13, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **Biosurfactant production by microorganisms on unconvetional carbon sources - a review**. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 2, p. 237-241, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **Recent applications of biosurfactantes as biological and immunological molecules**. *Curr Opin Microbiol.*, v. 7, p. 262, 2004.

MANRESA, M. A.; BASTIDA, M. E.; MERCADE, M. E.; ROBERT, M.; ANDRÉS, J. DE; SPUNY, M. J.; GUINEA, J. **Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1**. *Journal Microbiol.*, v. 8, p. 133-136, 1991.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENTS A. **High-performance liquid chromatography of rhamnolipids mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil**. *Journal Chromatogr. A.*, v. 864, p. 211-220, 1999.

MATSUFUJI, M.; NAKATA, K; YOSHIMOTO, A. **High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on etanol.** Biotechnol. Lett., v. 12, n. 19, p. 1213-1215, 1997.

MERCADE, M. E., MANRESA, M. A., ROBERT, M., ESPUNY, M. J., ANDRES, C., GUINEA, J. **Olive oil mill effluent (OOME): new substrate for biosurfactant production.** Bioresour. Technol., v. 43, p. 1-6, 1993.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. **The use of agroindustrial byproducts for biosurfactant production.** J. Am. Oil. Chem. Soc., v. 71, p. 61-64, 1994.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes.** Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 107-108, 2004.

MORÁN, A. C.; MARTÍNEZ, A. M.; SIÑERIZ, F. **Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity.** Biotechnology Letters, v. 24, p. 177-180, 2002.

MORTON, J. F. **Cashew Apple. In: Fruits of warm climates,** Miami, p. 239, 1997.

MORTON, J. F.; DOWLING, C. F. **Fruits of warm climates.** Creative Resources Systems, p. 239-240, 1987.

MOURA, C. F. H.; ALVES, R. E.; INNVECCO, R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; MOSCA, J. L., PINTO, S. A. **Características físicas de pedúnculos de cajueiro para comercialização *in natura*.** Rev. Bras. Fruticultura, v. 23, n. 3, 2001.

MUDAMBI, S. R.; RAJAGORPAL, M. V. **Vitamina C content of fruits grown in Nigeria.** Journal of Food Technology, Oxford, v. 12, n. 5, p. 189-191, 1977.

MULLIGAN, C. N.; COOPER, D. G. **Pressate from peat dewatering as a substrate for bacterial growth.** Applied and Environmental Microbiology, v. 50, n. 1, p. 160-162, 1985.

MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B. F. **The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production *Pseudomonas aeruginosa***. Journal of Biotechnonology, v. 12, p. 199-210, 1989a.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. **Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa***. Applied Environment Microbiology, v. 55, p. 3016-3019, 1989b.

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

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. **Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review**. Engineering Geology, v. 60, p. 371, 2001.

MULLIGAN, C. N. **Environmental applications for biosurfactantes**. Environ Polluut; 133, 183-198, 2005.

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

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. **Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M. **Produção e Caracterização de Biosurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando Manipueira como Substrato**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, p. 42-66, 2004.

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

OGUNMOYELA, O. A. **Prospects for cashew apple processing and utilization in Nigeria**. Process Biochemistry, Rickmanswart, v. 18, n. 2, p. 6-8, 1983.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. **Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin with recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 47, p. 209-214, 1995.

OLIVEIRA, M. E. B.; OLIVEIRA, G. S. F.; MAIA, G. A.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O. **Aminoácidos livres majoritários no suco de caju: variação ao longo da safra.** *Rev. Bras. Frutic.*, v. 24, p. 133-137, 2002.

OLIVEIRA, A.H.S.; **Produção e caracterização de ácido hialurônico obtido por fermentação do suco de caju com *Streptococcus zooepidemicus*.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2004.

OSHO, A. **Evaluation of cashew apple juice for single cell proteins and wine production.** *Nahrung-Food*, v. 39, p. 521-529.

PAES, F. A. **Perfil Fisiológico e Enzimático de Cepa de *Bacillus* e Screening para a Produção de Biosurfactantes.** Monografia defendida em 2006 na Universidade Federal do Ceará.

PARRA, J. L.; PASTOR, J.; COMELLES, F.; MANRESA, M. A.; BOSCH, M. P. **Studies of biosurfactants obtained from olive oil.** *Tenside Surf. Det.*, v. 27, p. 302-306, 1990.

PARKINSON, M. **Bio-Surfactants.** *Biotechnology Advs.*, v. 3, p. 65-83, 1985.

PATEL, R. M., DESAI, A. J. **Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses.** *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 25, p. 91-94, 1997.

PEREIRA, M. C. T.; CORREA, H. C. T.; NIETSCH, S.; MOTA, W. F.; MARQUES, S. V. **Caracterização físico-química de pedúnculo e castanha de clones de cajueiro-anão precoce nas condições do norte de Minas Gerais.** *Bragantia*, v. 64, n. 2, 2005.

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

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Rhamnolipid biosurfactant production by strain of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials.** *Biotechnology Prog.*, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C.; DE FRANÇA, F. P. **Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* grown on Low-Cost raw materials.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 113-116, p. 899-912, 2004.

ROBERT, M.; MERCADE, M. E.; BOSCH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. **Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T.** *Biotechnol. Lett.*, v. 11, p. 871-874, 1989.

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

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

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

SANTA ANNA, L. M. **Produção de biossurfactantes do tipo raminolipídeo por *Pseudomonas* sp.** Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Ciências Farmacêutica. Faculdade de Farmácia. Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA JR. N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. **Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91-93, p. 459-467, 2002.

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

SHAW, A. **Surfactants 94**. Soap Cosmetics Chemical Specialties, v. 70, n. 9, p. 24-34, 1994.

SHEPPARD, J. D. E MULLIGAN, C. N. **The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolyzate**. Appl Microbiol Biotechnol., v. 27, p. 110-116, 1987.

SIM, L.; WARD, O. P.; LI, Z-Y. **Production and characterization of biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1**. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.v. 19, p. 232-238. 1997.

SOUZA, P. A.; SIMÕES, A. N.; MENEZES, J. B.; ANDRADE, J. C.; FREITAS, D. F.; MENDONÇA, F. V. S. **Caracterização Química de Pedúnculos de Caju ‘CCP-76’ em Diferentes Estádios de Desenvolvimento**. Proceedings of the XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2002.

SUSUKI, T.; ITOH, S. Verfahren zur biotechnischen Herstellung rhamnosehaltiger glycolipide. Deutsches Patent 2 150 375 (Kyoma Hakko Kogyo Co. Ltd. Tokyo), 1992.

THIMON, L.; PEYPOUX, F. E.; MICHEL, M. G. **Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells**. FEMS Microbiol. Letters, v. 128, p. 101-106, 1995.

TODAR K. *Pseudomonas aeruginosa* – **Opportunist Infections**. Microbial World University of Wisconsin. 2005.

VANCE-HARROP, M. H.; SARUBBO, L. A.; CARNEIRO DA-CUNHA, M. G.; BUARQUE DE GUSMÃO, N.; CAMPO-TAKAKI, G. M. **Produção de Biosurfactante em Meio de Cultura de Baixo Custo suplementado com Óleo de Milho por *Candida lipolytica***. Revista Symposium Ciências Humanidades e Letras - Nova Fase v. 2, p. 23-27, 1999.

VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R. M.; PAULI, G. **Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis***. *Biologicals*, v. 25, p. 289-297, 1997a.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. **Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis***. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 44-49, 1997b.

VOLLBRECHT, E.; RAU, U.; LANG S. **Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella spec.*** *Fett/Lipid*, v. 101, p. 389-394, 1999.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N. **Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola***. *J. Am. Oil Chem. Soc.* v. 72, p. 67-71, 1995.

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

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

WEI, YU-HONG.; CHOU, CHIEN-LIANG.; CHANG, JO-SHU. **Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, Issue 2, p. 146-154, 2005.

WITTCOFF H. A.; REUBEN, B. G. **Industrial Organic Chemistry in Perspective, Parte 1**, Wiley Interscience, New York, p. 42, 1980.

WULLBRANDT, D.; GIANI, C.; MIXICH, J.; KUNZ, M.; RAPP, K. M.; VOGEL., M. 1994. **L-Rhamnose durch Fermentation panzlicher OÈ le**. *Apud*: Lang, S., and D. Wullbrandt. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 22-32. 1999.

YAKIMOV, E.; MARIANI, G.; PICHAUD, B. **Temperature-Dependence of Dislocation Efficiency as Sinks for Self-Interstitials in Silicon as Measured by Gold Diffusion.** Journal of Applied Physics, 78, 1495-1499. 1995.

YAMAGUCHI, M.; SATO, A.; YUKUYAMA, A. **Microbial production of sugar-lipids.** Chem. Ind., v. 4, p. 741-742, 1976.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. **Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers.** Biotechnol. Prog., v. 21, p. 1329-1334, 2005.

REFERÊNCIA DE DOCUMENTOS ELETRÔNICOS

Geosciences Technologies. Disponível em: www.georesources.com Acessado em: 19 de setembro de 2006.

Breve histórico dos acidentes geográficos. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/panorama/panorama.asp>. Acessado em: 27 de agosto de 2006.

ANEXO A

Descrição do Biorreator

O biorreator utilizado para o aumento da escala de produção de biossurfactante continha um sistema de coleta de dados, empregando placa de aquisição de sinais (National Instruments) sinais (National Instruments) e programação em LabVIEW. A interface máquina-usuário foi programada no software LabVIEW (versão 7.1) em microcomputador PC (Pentium 4, 3.00 GHz e 512MB de RAM), conforme Figura 1A. O biorreator é constituído de uma dorna (Marconi) de 4 litros de volume útil com controle e medidor de temperatura, medidor e transmissor de pH (Orion 410A+ e o eletrodo da Mettler Tolloedo), medidor e transmissor de oxigênio dissolvido (Mettler Tolloedo, modelo O₂-4500), sensor de nível, motor (Eberle modelo B63a4) e agitador mecânico, bombas peristálticas para adição de ácido, base, anti-espumante e meio suplementar (Figura 2A).

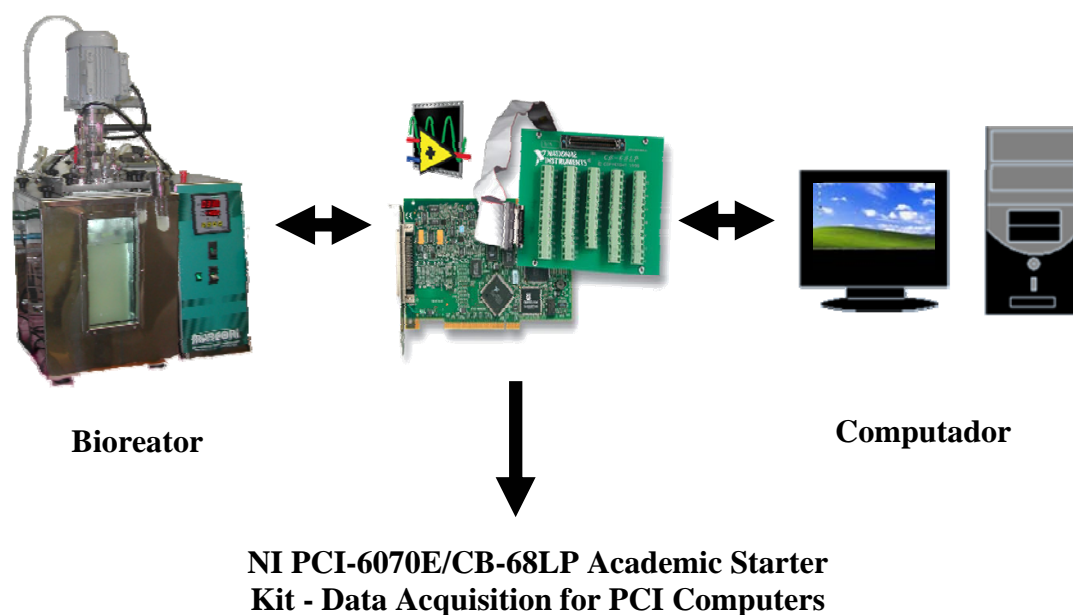


Figura 1A: Sistema de Aquisição de dados do Biorreator a ser utilizado no aumento de escala.

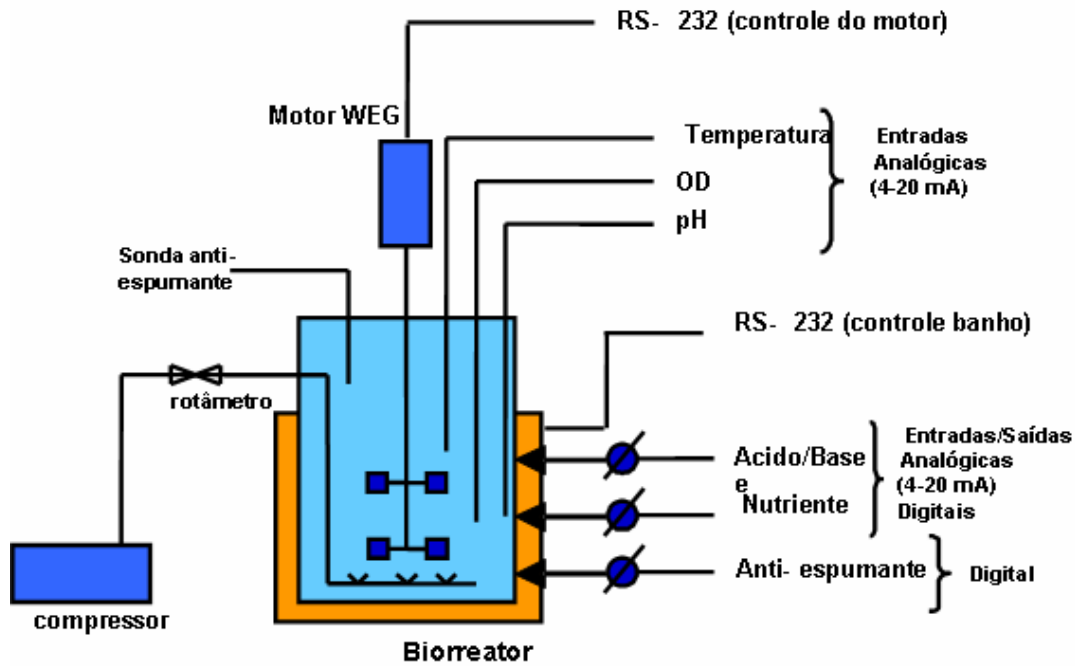


Figura 2A: Esquema do Biorreator que será utilizado para a produção biossurfactante.

A tampa do biorreator, confeccionada em aço inox, era presa a ele por meio de parafusos. Um motor (Eberle modelo B63a4) posicionado acima do reator foi acoplado a um eixo preso à tampa. Este eixo possuía três hélices, tipo turbina aberta (Figura 3A), cada uma com seis pás que promoviam a agitação. Acoplou-se a dorna de vidro uma chingana com a finalidade de diminuir a formação de vórtice.

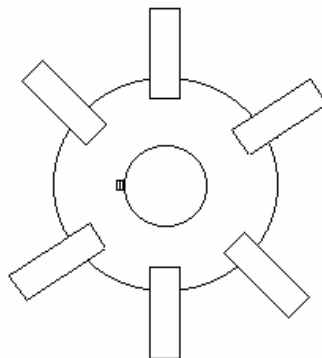


Figura 3A: Hélice tipo turbina aberta com seis pás presente no fermentador utilizada para a agitação.

O ar, proveniente de uma rede de ar comprimido, após passar por um controlador de fluxo (rotâmetro), era aspergido no fundo do fermentador, localizado abaixo da hélice de agitação, por meio de um aspersor de aço inox, tipo mergulhado (Figura 4A). Antes de entrar no reator, o ar era esterilizado usando um filtro (acetato de celulose, com poros de 0,20 μm) estéril à tampa por uma mangueira de silicone. No condensador acoplou-se uma mangueira de silicone, a qual se dava a saída de ar e esta foi imersa em solução de sulfato de cobre.

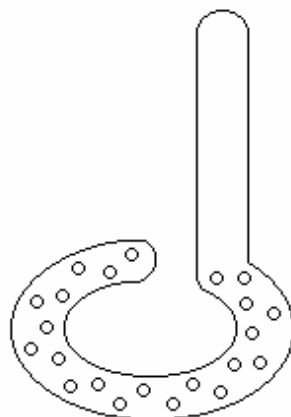
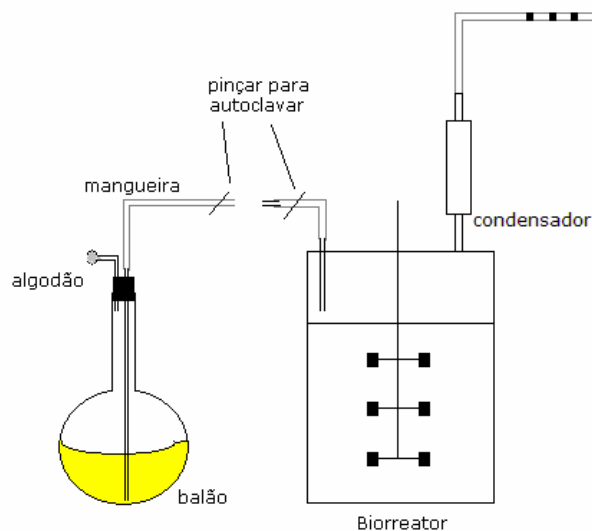


Figura 4A: Anel aspersor, que cobre uma grande área do fermentador e assegura melhor a dispersão de ar no biorreator.

O fermentador contendo 100 mL de água, juntamente com os eletrodos de pH e oxigênio dissolvido e filtro de ar, era esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos.

A Figura 5A apresenta a transferência do meio de cultivo, o qual era esterilizado separadamente do biorreator. Retirada de amostras foi realizada através do amostrador presente no reator que continha um tudo de aço inox, o qual ia até o fundo do reator (Figura 6A). Realizava-se um vácuo para possibilitar a saída da amostra, sendo os 20 mL primeiros descartados.



Figuras 5A: Transferência do meio de cultivo, autoclavado separadamente em balão, para o biorreator.

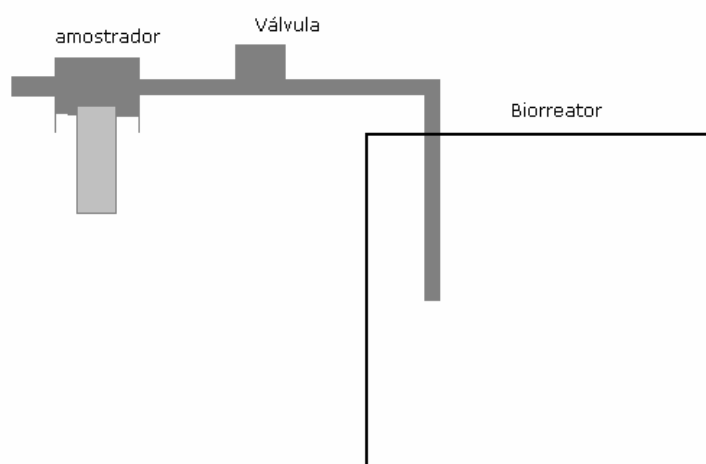


Figura 6A: Sistema utilizado para retiradas de amostras do biorreator.

Os parâmetros do processo fermentativo e do reator, como temperatura do meio e do banho termostaticado, pH, adição de ácido e base, oxigênio dissolvido, aeração e agitação foram controlados através do programa desenvolvido utilizando o software LabVIEW 7.1, estes encontram-se nas Figuras 7A a 10A.

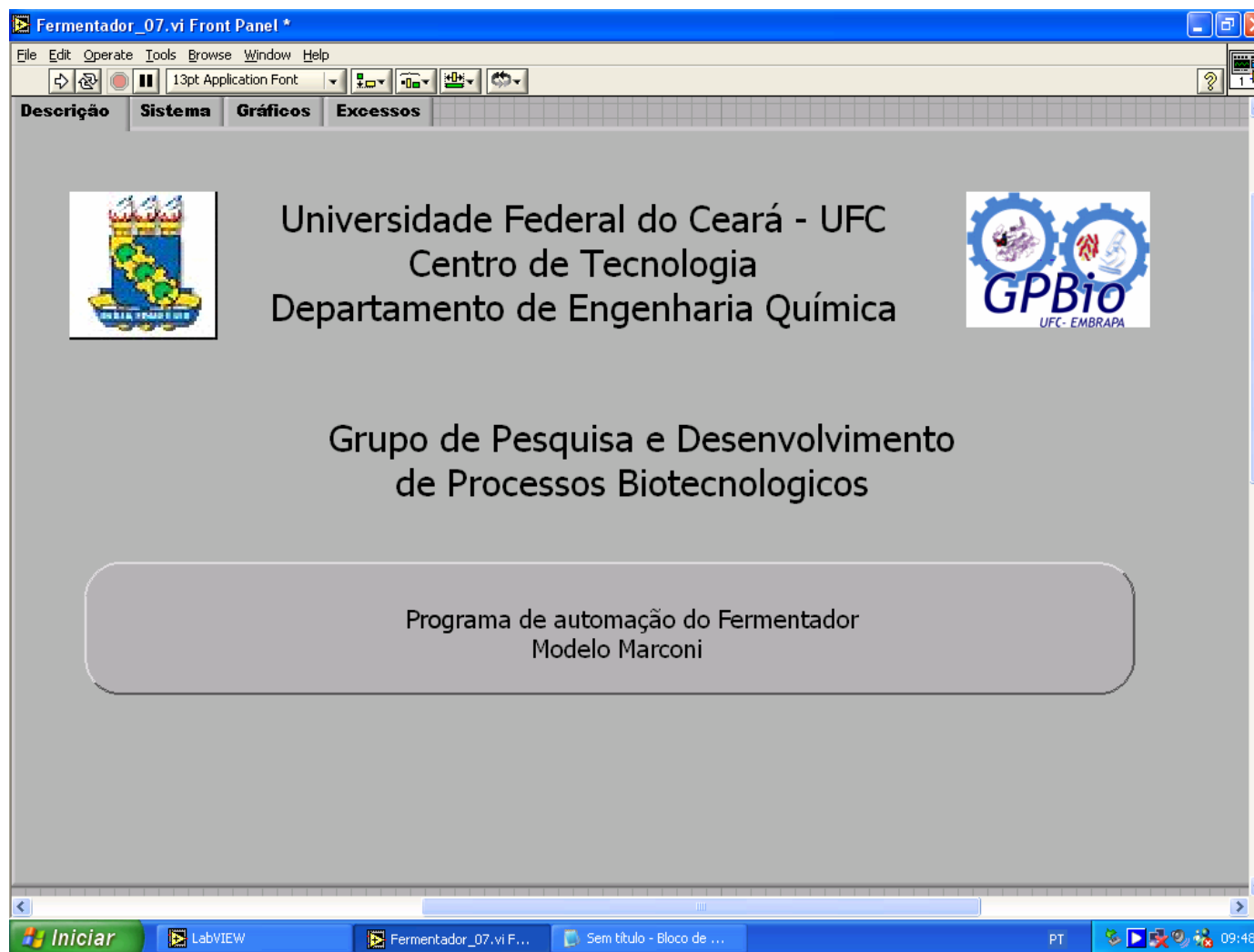


Figura 7A: Janela de Descrição do LabVIEW do Programa de Automação do Fermentador.

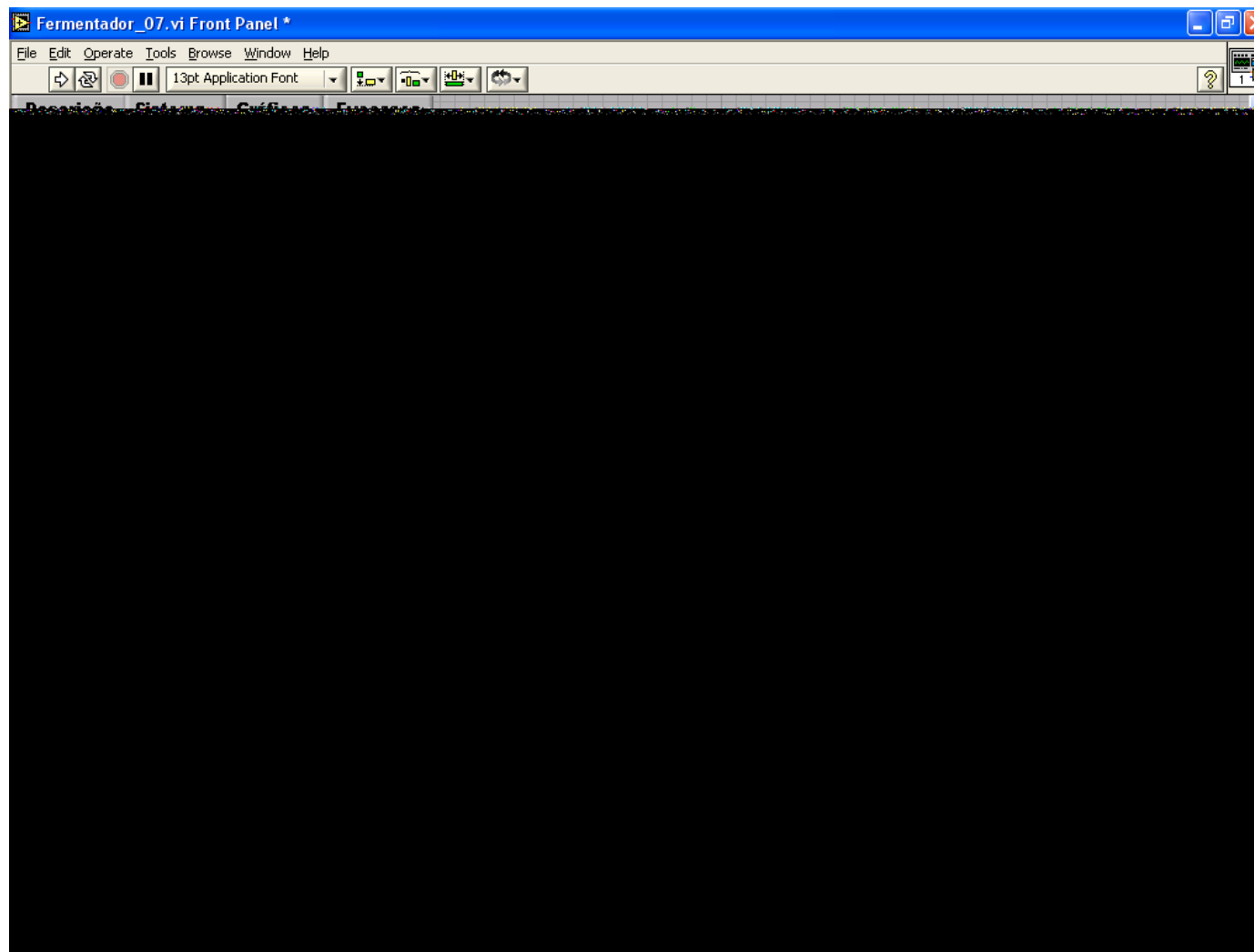


Figura 8A: Janela de entrada dos parâmetros e de configurações dos equipamentos utilizados na fermentação

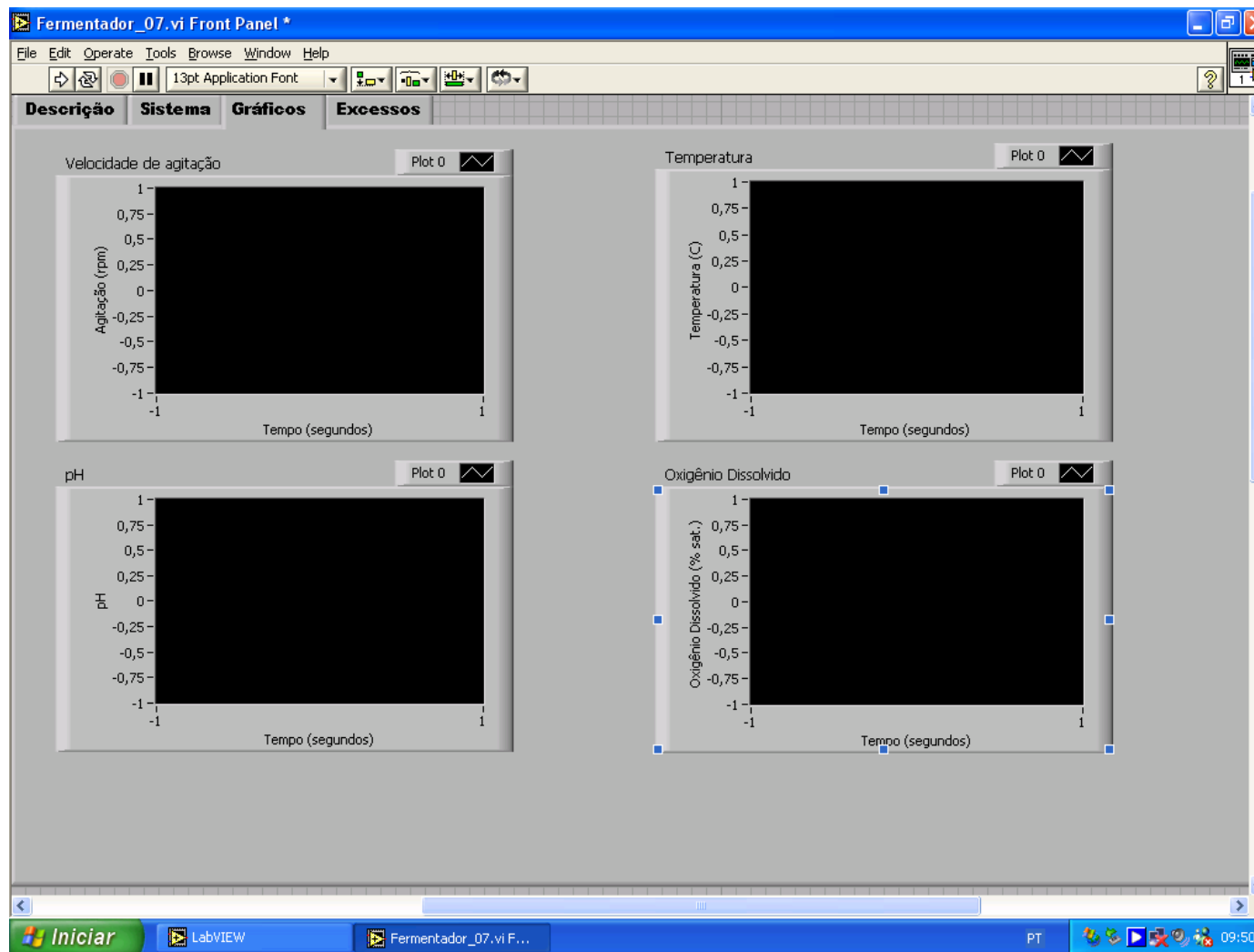


Figura 9A: Janela de apresentação dos controles do ensaio fermentativo através de gráficos.

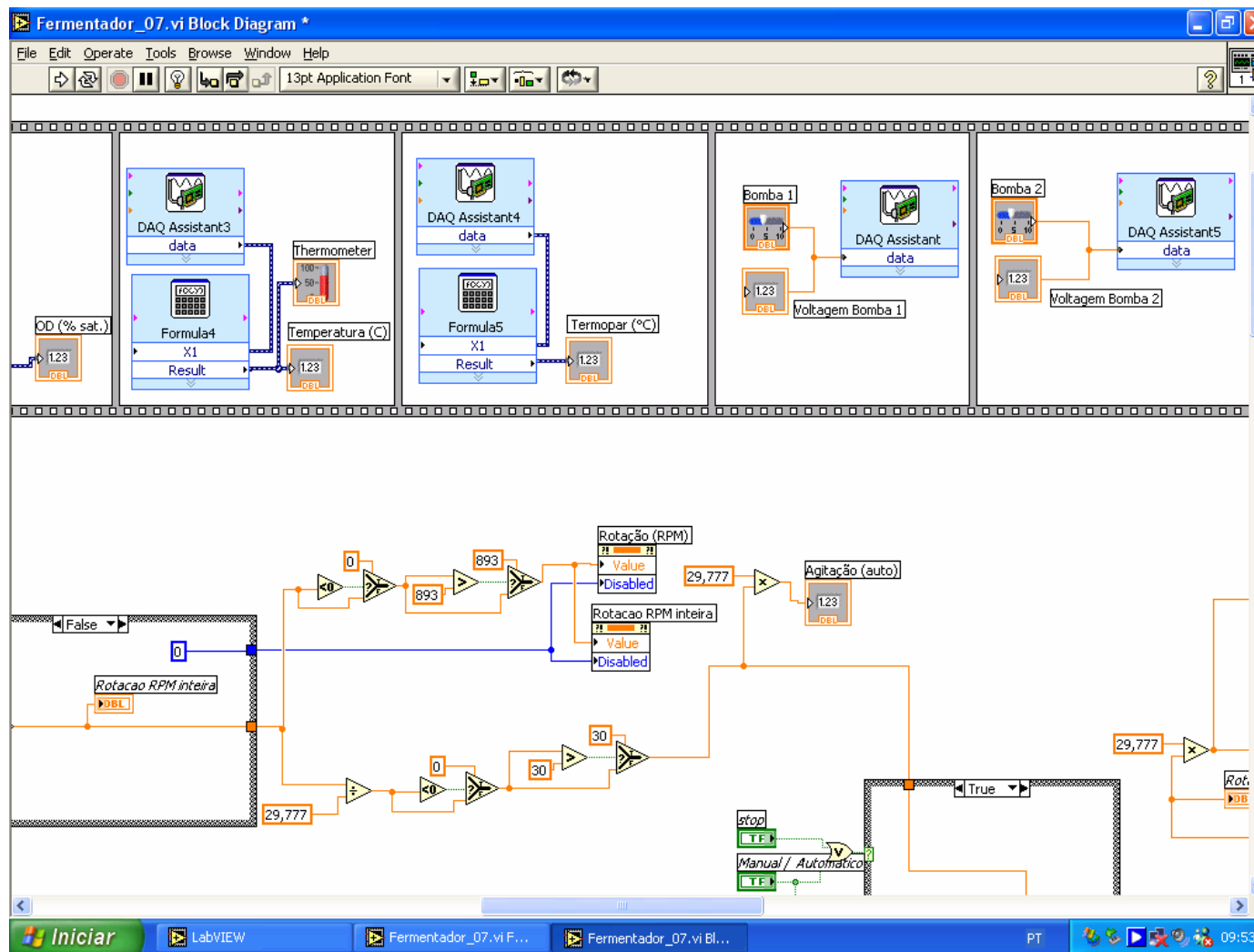


Figura 10A: Programação utilizando o LabVIEW (versão 7.1) para a automação do fermentador.

ANEXO B

Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em meio CAJP.

B.1. Efeito da concentração de NaCl na atividade surfactante

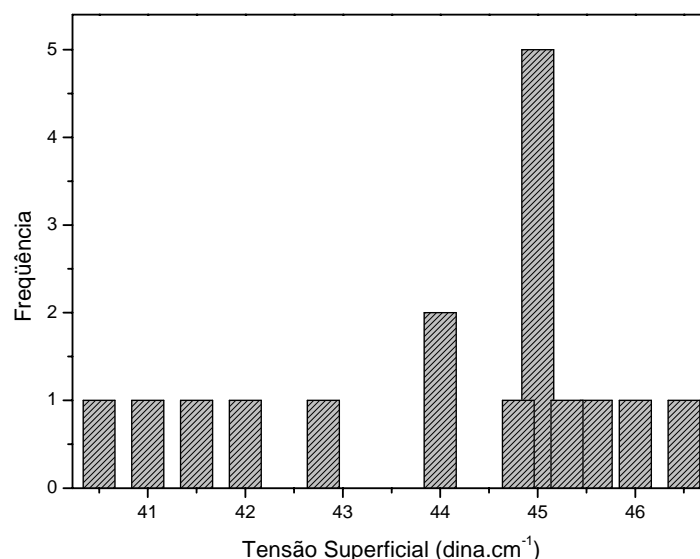


Figura 1B: Frequência das Tensões Superficiais no estudo feito da concentração de NaCl na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* no meio CAJP a 30 °C e 150 rpm.

Dados Obtidos das Análises ANOVA no Software Origin versão 6.0 Professional
One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(D):

Data	Mean	Variance	N
A	43,7200	5,917	5
B	45,5833	5,242	6
C	43,8500	3,439	6
D	42,933	4,013	3

F = 0,12655

p = 0,94299

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

B.2. Efeito do pH na atividade do biossurfactante

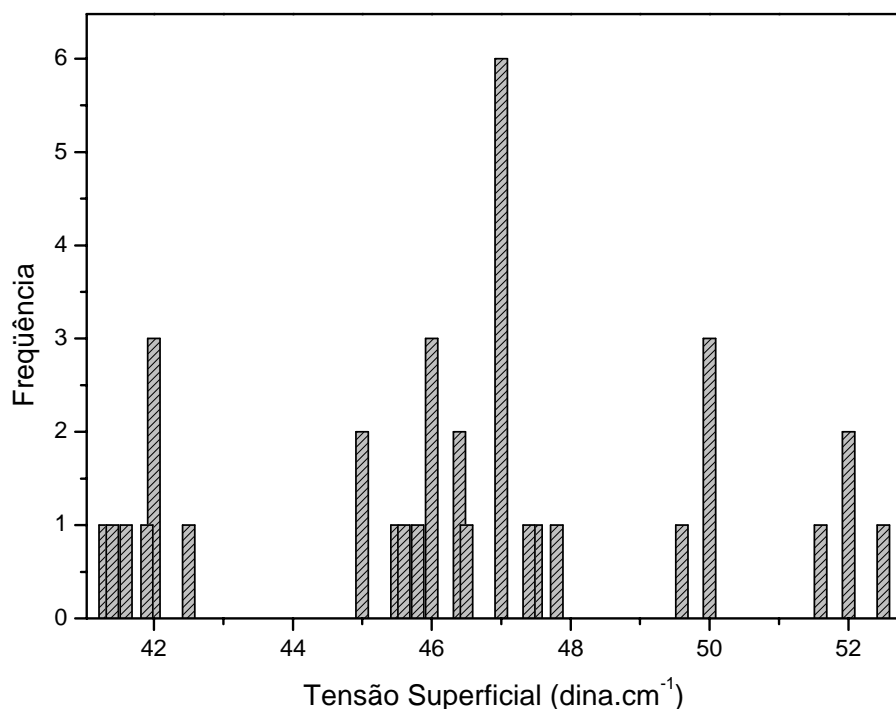


Figura 2B: Frequência das Tensões Superficiais no estudo feito do pH na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* no meio CAJP a 30 °C e 150 rpm.

Dados Obtidos das Análises ANOVA no Software Origin versão 6.0 Professional
One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(D):

Data	Mean	Variance	N
B	46,55556	11,4653	9
C	46,33333	11,0675	9
D	46,35556	10,9603	9
E	46,45556	10,9978	9

F = 0,00842

p = 0,99892

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

B.3. Efeito da Temperatura na atividade do biossurfactante

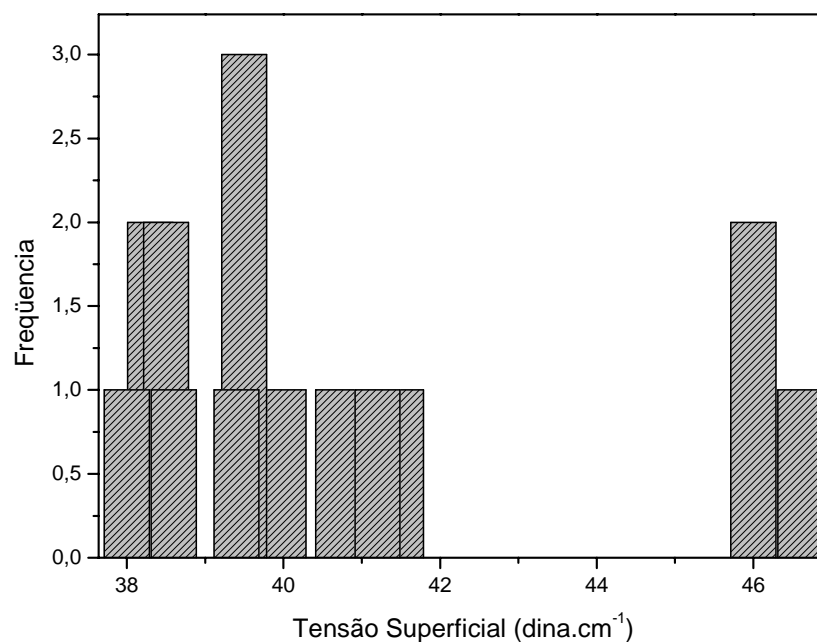


Figura 3B: Frequência das Tensões Superficiais no efeito do tempo de exposição à temperatura de 100 °C na atividade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* no meio CAJNP a 30 °C e 150 rpm.

Dados Obtidos das Análises ANOVA no Software Origin versão 6.0 Professional
One-Way ANOVA on columns selected between Col(B) -> Col(D):

Data	Mean	Variance	N
B	39,45	2,643	4
A	40,78	11,727	5
C	40,64	9,753	5
D	41,55	9,443	4

F = 0,34624

p = 0,79241

At the 0,05 level, the means are NOT significantly different.

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](#)