Willian Fernando Domingues Vilela

Seleção, caracterização e aplicação de novos biossurfatantes produzidos por bactérias marinhas a partir de substratos de baixo custo

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientadora: Marcia Nitschke

São Carlos
2014

AGRADECIMENTOS

- Às agencias de fomento Capes e Fapesp;
- Ao Centro Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas;
- Ao Instituto de Química de São Carlos pelos 8 anos da minha formação;
- À professora Marcia Nitschke pela orientação;
- Ao Grupo de Polímeros Bernhard Gross do Instituto de Física de São Carlos;
- A alguns Professores que contribuíram muito para minha formação e servirão de exemplo na minha carreira no magistério:

  Prof. José Delfino Pinto Sobrinho (Juquitiba/SP)
  Prof. Aguinaldo Robinson de Souza (UNESP – Bauru/SP)
  Prof. João Roberto Fernandes (UNESP – Bauru/SP)
  Prof. Albérico Borges Ferreira da Silva (USP – São Carlos/SP)
  Prof. Eduardo Bessa Azevedo (USP – São Carlos/SP)
- À minha noiva Jessica pelo carinho, companheirismo e incentivo;
- Aos grandes amigos que fiz durante essa trajetória, funcionários e alunos do Campus de São Carlos;
- E por fim, os meus maiores Mestres: meu Pai José Leonildo Marques Vilela e minha Mãe Iracema Domingues Vilela.

RESUMO

Seleção, caracterização e aplicação de novos biossurfatantes produzidos por bactérias marinhas a partir de substratos de baixo custo.

Os surfatantes, moléculas anfipáticas compostas por uma porção polar e outra apolar, constituem um grupo heterogêneo de compostos de superfície ativa. Sua porção polar pode ser formada por peptídeos, ânions ou cátions, por mono, di ou polissacarídeos, enquanto sua porção apolar pode ser formada por estruturas saturadas, insaturadas ou ácidos graxos hidroxilados, ou ainda peptídeos hidrofóbicos. Essas substâncias podem ser sintéticas, obtidas a partir de síntese química, ou produzidas por micro-organismos, principalmente, bactérias e leveduras, passando a ser denominadas biossurfatantes (BS). O BS representa uma alternativa aos tensoativos sintéticos utilizados em diversos seguimentos da indústria devido a sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, além de aplicabilidade na descontaminação ambiental. Bactérias isoladas em diversos biomas têm sido muito exploradas para produção de BS, enquanto ecossistemas marinhos ainda são pouco explorados, apesar do grande potencial existente. Os micro-organismos marinhos quando expostos a condições extremas de pressão, salinidade e temperatura produzem compostos estáveis e, portanto, úteis em aplicações industriais. O presente trabalho objetivou investigar novos BS produzidos por bactérias de origem marinha capazes de produzir tal substância a partir de fontes de carbono de baixo custo (glicerol, óleo de soja, vaselina e sacarose). Foram analisados 59 isolados bacterianos marinhos, as bactérias selecionadas foram identificadas e a produção do BS foi estudada em escala laboratorial. Após a extração do BS, suas propriedades físico-química como tensão superficial (TS), tensão interfacial (IT) e concentração micelar crítica (CMC) foram determinadas; além disso, foi realizada a caracterização estrutural preliminar e o seu potencial de aplicação para biorremediação de petróleo e como agente emulsificador. Os resultados identificaram a produção de BS por três bactérias marinhas: *Arthrobacter defluvii, Brevibacterium luteolum* e *Gordonia* sp. A partir das análises químicas foi possível identificar dois BS lipopepítidicos (*A. defluvii* e *B. luteolum*) e um BS com grupos glicosídicos (*Gordonia* sp.). O BS produzido por *A. defluvii* apresentou tensão superficial TS = 34,5 mN m^{-1}; TI = 15 mN m^{-1}; e CMC = 129 mg L^{-1} crescendo em óleo de soja, B. luteolum TS = 27 mN m-1; TI = 0,84 mN m-1; e CMC = 40 mg L^{-1} crescendo em vaselina e *Gordonia* sp. TS = 33 mN m^{-1}; TI = 1,4 mN m^{-1}; e CMC = 85 mg L^{-1} crescendo em óleo de soja. Os BS estudados apresentaram capacidade de remoção de petróleo de areia contaminada, assim como atividade emulsificante frente a diferentes substâncias (óleo de soja, vaselina, decano, querosene, hexadecano e gordura vegetal). Os testes de estabilidade realizados para BS produzido por *B. luteolum* indicaram que: o BS é estável quando submetido a temperaturas até 60^{o}C por 24 h e até 121^{o}C por 20 min; a maior atividade tensoativa para o BS é encontrada em solução com pH entre 6 e 8; e a força iônica não afeta a atividade tensoativa até concentrações salinas abaixo de 16%. Portanto, os três micro-organismos marinhos selecionados foram capazes de produzir compostos com relevante atividade tensoativa utilizando substratos de baixo custo.

Palavras-chaves: biossurfatantes, biotensoativo, bioemulsificantes, bactérias marinhas, substratos de baixo custo

ABSTRACT

Selection, caracterization and application of biosurfactants produced by marine bacterial using low-cost substrates

The surfactants, amphipathic molecules containing both polar and nonpolar portions, are a heterogeneous group of surface-active compounds. Its polar portion may be composed by peptides, anions or cations, mono, di, or polysaccharides, while its polar portion may contain saturated, unsaturated or hydroxylated fatty acids or hydrophobic peptides. These molecules may be synthetic, derived from chemical synthesis, or produced by microorganisms, mainly bacteria and yeast, and also known as biosurfactants (BS). The BS represent an alternative to synthetic surfactants used in various segments of industry due to their low toxicity and high biodegradability. The major classes of BS include glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, phospholipids, fatty acids and polymeric surfactants. Bacteria isolated from different biomes have been heavily exploited for BS production, while marine ecosystems are still poorly explored, despite its great potential. The marine microorganisms when exposed to extremes of pressure, temperature and salinity, produce stable compounds and, therefore, useful in industrial applications. The aim of this study was to investigate new BS produced by marine bacteria capable of producing such molecules growing in low-cost carbon sources (mineral oil, sucrose, soybean oil and glycerol). The selected bacterial isolates were identified and the biosurfactant production was studied in laboratory scale. After extraction of BS their physicochemical properties as surface tension (ST), interfacial tension (IT) and critical micelle concentration (CMC) were determined; preliminary structural characterization evaluated by FTIR and TLC and their potential application in bioremediation of crude oil and as emulsifier was also investigated. The results identified the BS production by three marine bacteria *Arthrobacter defluvii*, *Brevibacterium luteolum* and *Gordonia* sp. Based on the chemical analysis it was possible to identify two lipopeptides BS (*A. defluvii and B. luteolum*) and a BS with glycosides groups (*Gordonia* sp.). The BS produced by *A. defluvii* growing in soybean oil showed ST = 34,5 mNm^{-1}; IT = 15 mNm^{-1} and CMC = 129 mgL^{-1}; *B. luteolum* growing in mineral oil showed a ST = 27 mNm^{-1}, IT = 0,84 mNm^{-1} and CMC = 40 mgL^{-1} and *Gordonia* sp. growing in soybean oil showed ST = 33 mNm^{-1}, IT = 1,4 mNm^{-1} and CMC = 85 mgL^{-1}. The BS obtained exhibited capacity to remove crude oil from contaminated sand as well as emulsifying activity against different hydrophobic substances (soybean oil, mineral oil, decane, kerosene, animal fat and hexadecane). Stability tests carried out to BS produced by *B. luteolum* indicated that: the BS is stable when submitted to temperatures down to 60 ° C for 24 h to 121 ° C for 20 min; the higher activity to the BS is found in solution with pH between 6 and 8; and the ionic strength does not affect the surfactant activity until salt concentrations under 16%. Therefore, the three selected marine micro-organisms were able to produce compounds with significant surfactant activity using low cost substrates.

Keywords: biosurfactant, surface-active agent, bioemulsifier, marine bacteria, low cost substrates

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3
2.1 Surfatantes 3
2.2 Biossurfatantes 8
2.2.1 Produção de Biossurfatantes 14
2.2.2 Produção de BS utilizando micro-organismos marinhos 15
2.2.3 Aplicações dos BS 18
2.2.3.1 Biorremediação 19
2.2.3.1.1 Biodegradação de hidrocarbonetos 19
2.2.4 Produção de BS utilizando substratos de baixo custo 21
3 OBJETIVOS 23
3.1 Objetivo Geral 23
3.2 Específicos 23
4 MATERIAIS E MÉTODOS 24
4.1 Micro-organismos 24
4.2 Composição dos meios de cultivo 25
4.3 Seleção dos micro-organimos produtores de BS 25
4.3.1 Técnicas Analíticas 26
4.3.1.1 Determinação da atividade tensoativa 26
4.3.1.1.1 Método do colapso da Gota (MCG) 26
4.3.1.1.2 Determinação da tensão superficial 27
4.3.1.2 Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (DO) 29
4.3.1.3 Método de diluição seriada e contagem de colônias 30
4.3.1.4 Concentração micelar Crítica (CMC) 30
4.3.1.5 Diluição Micelar Crítica (CMD) 31
4.3.1.6 Quantificação de proteínas (Método de Lowry) 31
4.4 Identificação dos isolados microbianos selecionados 32
4.4.1 Taxonomia convencional 32
4.4.2 Taxonomia molecular 32
4.5 Cinética de produção dos BS 33
4.5.1 Curva de crescimento 33
4.5.2 Processo de produção para avaliação cinética 34
4.6 Produção dos Biossurfatantes 35
4.7 Extração dos Biossurfatantes 35
4.8 Caracterização físico-química dos BS 36
4.9 Caracterização estrutural preliminar 36
4.9.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTF) 36
4.9.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD) 37
4.10 Aplicações 37
4.10.1 Atividade emulsificante 37
4.10.2 Biorremediação de petróleo 38
4.10.3 Teste de Estabilidade 38
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 40
5.1 Seleção dos Micro-organismos produtores de BS 40
5.2 Identificação dos micro-organismos produtores de BS 44
5.3 Cinética de produção dos Biossurfatantes 45
5.3.1 Cinética de produção do Biossurfatantes produzido por *A. defluvii* 45
5.3.2 Cinética de produção do Biossurfatantes produzido por *B. luteolum* 46

5.3.3 Cinética de produção do Biossurfatantes produzido por *Gordonia* sp. 47
5.4 Produção dos Biossurfatantes 48
5.4.1 Extração dos Biossurfatantes 49
5.5 Caracterização físico-química dos Biossurfatantes 49
5.5.1 Determinação da Tensão Superficial, interfacial e CMC 49
5.6 Potencial de aplicação dos BS selecionados 51
5.6.1 Teste de atividade emulsificante 51
5.6.2 Teste de Biorremediação 54
5.7 Caracterização estrutural preliminar 56
5.7.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD) 56
5.7.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTR) 59
5.7.3 Teste de Estabilidade 62
6 CONCLUSÕES 66
7 PERSPECTIVAS 67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1- Representação esquemática de uma molécula de surfatante..... 4

Figura 2-2 - Representação esquemática de um sistema bifásico (a) antes e (b) após adição de surfatante 4

Figura 2-3 - Representação esquemática de (a) corte longitudinal 2D de uma estrutura micelar e (b) variação da tensão superficial com o logaritmo da concentração de surfatante..... 5

Figura 2-4 - Representação esquemática da estrutura micelar formada pelo dodecilsulfato de sódio (SDS) em água..... 6

Figura 2-5 - Representação esquemática da formação de emulsões (a) água em óleo e (b) óleo em água 7

Figura 2-6 – Estrutura química de alguns dos principais BS (a) soforolipídeo; (b) mono-ramnolipídeos (Rha-C_m-C_n), (c) di-ramnolipídeo (Rha_2-C_m-C_n) onde m,n = 6-18; (d) trealolipídeo ; (e) emulsan e (f) surfactina 11

Figura 4-1 – Representação simplificada das fases de seleção dos micro-organismos. 24

Figura 4-2 – Procedimentos e reagentes utilizados na seleção dos micro-organismos .. 26

Figura 4-3 - Medidor de ângulo de contato e tensão superficial KSV CAM 101 27

Figura 4-4 – Método da gota pendente (a) Modelo teórico para o calculo da tensão superficial e (b) imagem experimental da gota pendente. 28

Figura 4-5- Representação esquemática do método *Du Nouy Ring* 28

Figura 4-6 - Representação esquemática da correlação entre um método direto (contagem de colônias – UFC) e método indireto (DO) de medida de concentração celular microbiana. 29

Figura 4-7 – Representação esquemática do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) 30

Figura 4-8 - Determinação da CMC através de adições sucessivas de surfatante..... 31

Figura 4-9 - Procedimentos e reagentes utilizados nos experimentos da cinética de produção do BS 34

Figura 5-1 - Cinética de produção do BS produzido por *Arthrobacter defluvii* sp.. 46

Figura 5-2 - Cinética de produção do BS produzido por *Brevibacterium luteolum*..... 47

Figura 5-3 - Cinética de produção para o BS produzido por *Gordonia* sp.. 48

Figura 5-4 - Tensão superficial da solução 1g L^{-1} (A) e CMC (B) dos BS produzidos por *A. defluvii, B. luteolum*, *Gordonia* sp. 50

Figura 5-5 - Tensão interfacial entre hexadecano e solução 1 g L^{-1} dos BS produzidos por *A. defluvii, B. luteolum, Gordonia* sp. 51

Figura 5-6 - Atividade emulsificante dos BS produzidos por *A. defluvii, B. luteolum, Gordonia* sp. em diferentes compostos orgânicos 53

Figura 5-7 - Teste de emulsificação para BS produzido por *B. luteolum.* 53

Figura 5-8 - Remoção de petróleo em areia após lavagem com BS 55

Figura 5-9 - Ilustração da placa de cromatografia em camada delgada do extrato bruto do BS produzido por *Arthrobacter defluvii.* 56

Figura 5-10 - Ilustração da placa de cromatografia em camada delgada do extrato bruto do BS produzido por *Brevibacterium luteolum* 57

Figura 5-11 - Ilustração da placa de cromatografia em camada delgada do extrato bruto do BS produzido por *Gordonia* sp. 58

Figura 5-12 - Espectro de infravermelho do BS produzido por *A. defluvii.* 60

Figura 5-13 - Espectro de infravermelho do BS produzido por *B. luteolum* 61

Figura 5-14 - Espectro de infravermelho do Biossurfatante produzido por *Gordonia* sp. 62

Figura 5-15 - Estabilidade Térmica do BS produzido por *Brevibacterium luteolum* 63

Figura 5-16 - Estabilidade do BS produzido por *B. luteolum* em diferentes concentrações salinas. 64

Figura 5-17 - Estabilidade do BS produzido por *B. luteolum* em diferentes concentrações hidrogenionicas (pH). 65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2-1 – Propriedades dos principais surfatantes sintéticos 6

Tabela 2-2 – Indicações de aplicações dos surfatantes de acordo com a faixa de HLB... 8

Tabela 2-3 – Principais BS produzidos por micro-organismos e suas aplicações..... 10

Tabela 2-4 - Micro-organismos marinhos produtores de BS 18

Tabela 2-5 – Principais substratos de baixo custo utilizado na produção de BS 23

Tabela 5-1 - Gêneros de isolados marinhos estudados 40

Tabela 5-2 – Resultados da seleção preliminar de micro-organismos através de medidas de tensão superficial (MGP) e teste do colapso da gota 41

Tabela 5-3 - Resultados da pré-cinética de produção de BS utilizando medidas de tensão superficial e teste do colapso da gota..... 42

Tabela 5-4 - Identificação dos isolados microbianos produtores de BS..... 44

Tabela 5-5 - Principais características morfológicas das espécies bacterianas selecionadas . 44

Tabela 5-6 - Classificação taxonômica das espécies selecionadas..... 44

Tabela 5-7 - Tempo de produção para os micro-organismos selecionados 48

Tabela 5-8 - Métodos de extração mais eficientes para os micro-organismos selecionados..... 49

Tabela 5-9 - Resumo das análises em CCD para os BS isolados..... 58

Tabela 5-10 - Resumo das análises em CCD para os padrões utilizados 58

LISTA DE ABREVIATURAS

%E24	Atividade emusificante relativa após 24 horas
BS	Biossurfatante
CMC	Concentração micelar crítica
CMD	Diluição micelar crítica
DO	Densidade óptica
EPS	Exopolissacarídeo
HLB	*Hidrofilic Lipofilic Balance*
MCG	Método do colapso da gota
MDNR	Método Du Nouy Ring
MGP	Método da Gota pendente
TI	Tensão interfacial
TS	Tensão Superfícial

1 INTRODUÇÃO

Surfatante[1] são compostos que possuem atividade na interface entre duas fases (líquido-líquido, líquido-ar ou líquido-sólido). O termo "surfactant" foi primeiro utilizado por *Antara Products* como a contração do nome composto "surface active agent" e desde então é o nome mais difundido em língua inglesa para denominar este abrangente grupo de compostos (MISHARA et al., 2009). Estruturalmente os surfatantes caracterizam-se por moléculas compostas por uma parte polar (hidrofílica) e outra parte apolar (hidrofílica). Tais características fazem com que estas moléculas se concentrem em superfícies provocando a redução da tensão superficial/interfacial e a estabilização de emulsões. Na indústria os surfatantes têm sido utilizados como agentes emulsificadores, solubilizadores, condicionadores, molhantes, dispersantes ou detergentes (MISHARA et al., 2009).

Os surfatantes são compostos extremamente importantes para indústria e com mercado em plena expansão, atingindo em 2012 a movimentação financeira de $27,040 bilhões e com previsão de atingir $36,518 bilhões até 2017(EDSER, 2012c; REPORTLINKER, 2012). No Brasil este mercado movimentou em 2011 o valor de $1,31 bilhões e deve atingir $1,90 bilhões até 2018 (EDSER, 2013). A aplicação dos tensoativos se distribui em diversos setores da indústria como agentes emulsificadores, solubilizadores, condicionadores, molhantes, dispersantes ou detergentes (MISHARA et al., 2009). A maioria dos tensoativos disponíveis no mercado é sintetizada quimicamente a partir de derivados do petróleo e óleoquímicos (vegetais ou animais) (ZOLLER e SOSIS, 2009). Por vários fatores de ordem econômica, saúde e ambiental, a indústria tem sido pressionada a encontrar novas fontes de material prima renovável para produção de surfatantes (EDSER, 2012a; FOLEY et al., 2012).

A pesquisa utilizando os métodos convencionais de sintese química não mais oferecem avanços significativos no desenvolvimento de surfatantes mais eficientes, além disso, utilizam derivados de petróleo e resultam em compostos altamente recalcitrantes e tóxicos. Por isso, há uma pressão da sociedade e dos governos para que indústria encontre novas alternativas para produção de compostos menos agressivos a saúde e ao meio ambiente, de baixo custo e que sejam eficientes sob

[1] Em língua Portuguesa os termos agente tensoativo, surfactante e surfatante têm sido utilizado como tradução da palavra *Surfactant* (*Surface Active Agente*), sendo este último a grafia adotada pelos principais dicionários e nesta tese.

condições variáveis (EDSER, 2012a; FOLEY et al., 2012). Nesse sentido, a utilização de tensoativos produzidos por micro-organismos tem se mostrado extremamente promissor. Na literatura tais compostos têm sido chamados de biotensoativos ou biossurfatantes (BS), este último será o termo adotado nesta tese. Vale destacar que a atividade dos BS pode ser comparada a dos surfatantes sintéticos, além de apresentar características que os tornam ainda mais atrativos para indústria, tais como biocompatibilidade; biodegradabilidade; estabilidade frente a extremos de temperatura, pH e salinidade; e podem ser produzidos utilizando substratos renováveis e de custos reduzidos, além da possibilidade de alterar sua estrutura, portanto suas propriedades, através de técnicas de manipulação genética, biológica ou bioquímica (FOLEY et al., 2012).

Desde a década de 1980 inúmeros trabalhos descrevem a caracterização de novos BS e suas aplicações (GUERRA et al., 1983; JENNEMAN et al., 1983; SINGER et al., 1983; VOLKERING, BREURE e RULKENS, 1997; BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000; KITAMOTO et al., 2009). Dentre as aplicações comerciais desenvolvidas pode-se destacar a recuperação melhorada de petróleo, a biorremediação de poluentes, assim como aditivo em diversas formulações na indústria cosmética, alimentícia, têxtil e farmacêutica (BANAT et al., 2010; COSTA et al., 2010; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Dentre todos os micro-organismos estudados as bactérias se destacam como principal grupo produtor de BS, em especial, a surfactina de *Bacillus subtilis*, ramnolipideos de *Pseudomonas aeruginosa* e o emulsan de *Acinetobacter calcoaceticus* utilizados comercialmente (GARTI, 1999; GORKOVENKO et al., 1999; SHALIGRAM e SINGHAL, 2010; MULLER et al., 2012). Os micro-organismos presentes em ecossistemas ditos "extremos" como o ambiente marinho também tem sido objeto de pesquisa para produção de BS, se destacam por desenvolverem estratégias metabólicas que os fazem suportar ambientes limites para existência da vida e consequentemente produzir compostos com elevada atividade tensoativa em condições diversas, o que os tornam de grande interesse para indústria química (LAMBAIS et al., 2006; BAHARUM, BENG e MOKHTAR, 2010). Por essa razão, a busca por BS produzidos por micro-organismos marinhos tem aumentado progressivamente na última década, principalmente por apresentarem propriedades singulares como a atividade tensoativa estável em altas concentrações de eletrólitos, temperatura e pressão (SATPUTE et al., 2010a).

Constantes flutuações nos preços da matéria-prima de processo químicos (petróleo e óleo vegetais) e perspectiva da descoberta de novos BS impulsionam ainda mais a pesquisa nessa área (ACHTMAN e WAGNER, 2008; MCINTYRE, 2010; EDSER, 2012b). No entanto, como em todo processo biotecnológico, a aplicação comercial dos BS tem dificuldade em tornar-se competitivo no mercado, devido principalmente ao alto custo da matéria-prima utilizada e dos processos de recuperação do produto (CHEN, 2012). Assim, a utilização de substratos alternativos de baixo-custo aparece como interessante estratégia para viabilizar a produção de BS em larga escala. Inúmeros BS tem sido produzidos a partir de substratos agroindustriais, dentre eles: óleos vegetais, resíduos de óleos de cozinha, resíduos de destilaria de óleos, resíduos da indústria de laticínios, melaço de cana-de-açúcar, manipueira e glicerina (FOLEY et al., 2012). Logo, o Brasil pode assumir posição de grande destaque caso a produção de BS em larga escala se torne uma realidade, visto que constitui um dos países com maior produção agroindustrial.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias de origem marinha capazes de produzir moléculas tensoativas a partir de substratos de baixo custo. A partir da seleção e identificação foi estudada a produção de BS em escala laboratorial, assim como, a extração e caracterização bioquímica dos mesmos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfatantes

Surfatantes são moléculas que possuem domínios com polaridades opostas (polar e apolar), desta forma podem interagir tanto com substâncias hidrofóbicas como o óleo quanto hidrofílicas como a água (Figura 2.1). Tais substâncias quando adicionadas em um sistema bifásico tendem a se distribuírem na superfície de interface reduzindo a tensão superficial (ar/líquido) ou interfacial (líquido/líquido) do sistema, desse modo são conhecidas como compostos tensoativos.

A cadeia hidrofílica geralmente é formada por grupos como: ácidos carboxílicos, álcoois, carboidratos, peptídeos ou fosfatos. Enquanto a parte hidrofóbica é frequentemente formada por ácidos graxos saturados ou insaturados (MISHARA et al., 2009).

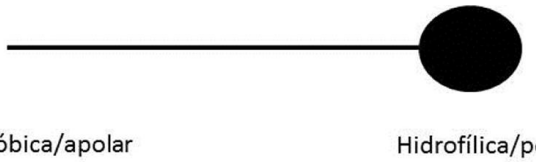

Figura 2-1- Representação esquemática de uma molécula de surfatante

Moléculas em um sistema bifásico experimentam um balanço de força como indicado na Figura 2.2a onde o excesso de energia presente na superfície é chamado de Energia livre de superfície e pode ser quantificada com uma unidade de energia/área. Usualmente é utilizada a medida de tensão da superfície, ou seja, a intensidade de força necessária para romper a superfície por unidade de área (mN m^{-1}).

Ao adicionar surfatantes ao sistema, as moléculas tensoativas irão se distribuir na interface do sistema, dessa forma a molécula do tensoativo se posiciona perpendicularmente a essa superfície, fazendo com que as partes de polaridades opostas do tensoativo se solubilizem preferencialmente em diferentes fases de um sistema bifásico (Figura 2.2b). Como consequência ocorre à perturbação do balanço de forças do sistema e consequente redução da tensão superficial/interfacial (DALTIN, 2011).

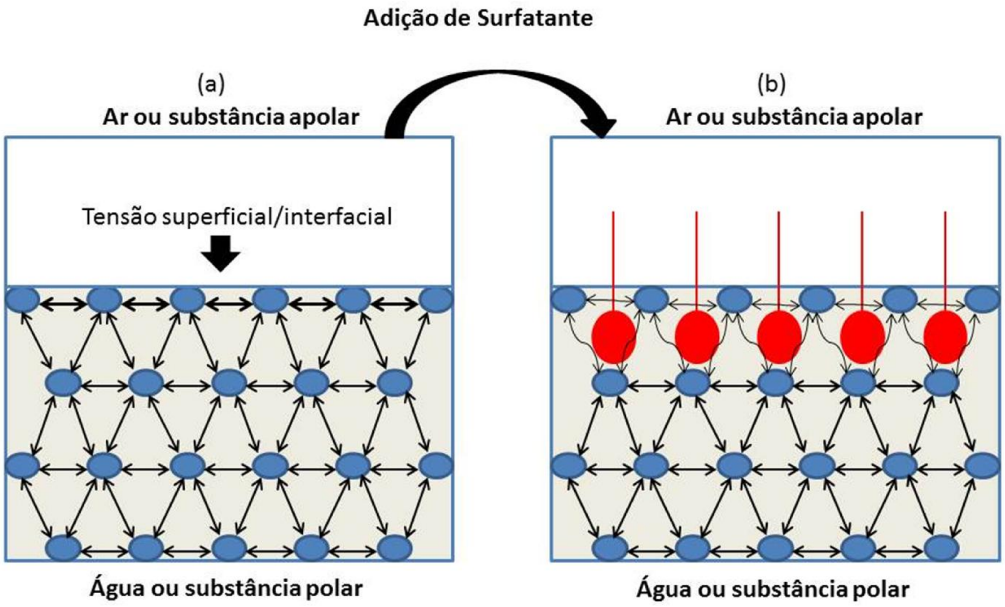

Figura 2-2 - Representação esquemática de um sistema bifásico (a) antes e (b) após adição de surfatante

Quando toda superfície do sistema é preenchida, moléculas de surfatantes começam a ocupar o interior do sistema e se organizar em aglomerados a fim de minimizar o contato de cadeias de polaridade oposta ao solvente. Uma das formas de arranjo encontradas é a micelar, neste caso, a estrutura é organizada de forma esférica de forma a esconder as cadeias de polaridade oposta ao do sistema (Figura 2.3a). Como resultado a tensão superficial não é alterada mais pela adição de surfatantes, este ponto é chamado de concentração micelar crítica (CMC), como podemos ver na Figura 2.3b (DALTIN, 2011).

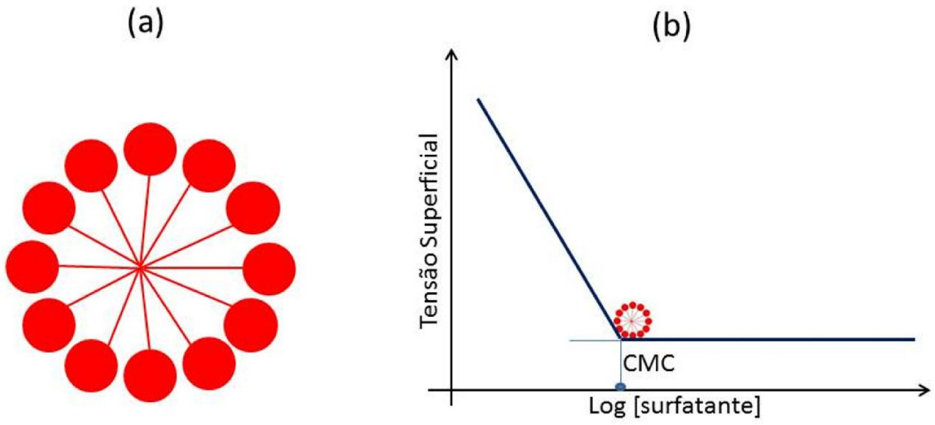

Figura 2-3 - Representação esquemática de (a) corte longitudinal 2D de uma estrutura micelar e (b) variação da tensão superficial com o logaritmo da concentração de surfatante

Em um solvente polar como a água, a cadeia hidrofílica do surfatante ficará em contato com o sistema e a parte hidrofóbica protegida dentro da micela. A Figura 2.4 mostra uma micela formada por dodecilsulfato de sódio em solução aquosa. Note que o grupo polar (SO_4^{-2}) esta em contato com o solvente e o interior sem nenhuma molécula de água.

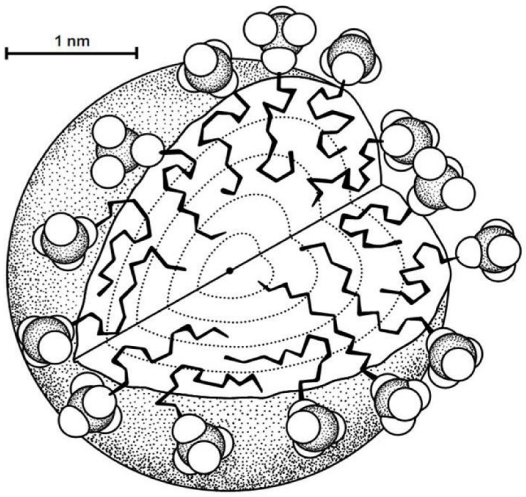

Figura 2-4 - Representação esquemática da estrutura micelar formada pelo dodecilsulfato de sódio (SDS) em água.
Fonte: (ISRAELACHVILI, 2011)

Também existem estruturas micelares onde é verificada a inversão das moléculas de tensoativos, isso ocorre quando o surfatante é adicionado em um meio apolar (óleo), logo a parte polar do tensoativo ficará concentrada no interior da micela, esta conformação é chamada de micela reversa (ISRAELACHVILI, 2011). A Tabela 2.1 exibe quatro dos principais surfatantes sintéticos disponível comercialmente.

Tabela 2-1 – Propriedades dos principais surfatantes sintéticos

Surfatante Sintético	Massa molecular ($gmol^{-1}$)	CMC (mgL^{-1})
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	288	2420
Dodecilbenzenosulfonato de sódio (DBS)	324	390
Laurilsulfato de sódio polietoxilado (Steol CS-330)	442	1460
Disulfato difenil oxido polietoxilado sorbitan (DPDS)	642	4040

Fonte: (DESHPANDE et al., 1999)

Contudo, quando um sistema bifásico (água/óleo) contendo surfatantes em concentração acima da CMC é agitado, moléculas do tensoativo migram da interface para outras superfícies água-óleo. Desta forma ocorre a formação de agregados óleo-surfatante no interior da fase aquosa e agregados água-surfatante no interior da fase óleo, tais arranjos são chamados de emulsões (Figura 2.5). Similarmente, a propriedade

de limpeza ou detergência, intrínseca aos surfatantes, ocorre através de mecanismo semelhante à formação de emulsões (MISHARA et al., 2009).

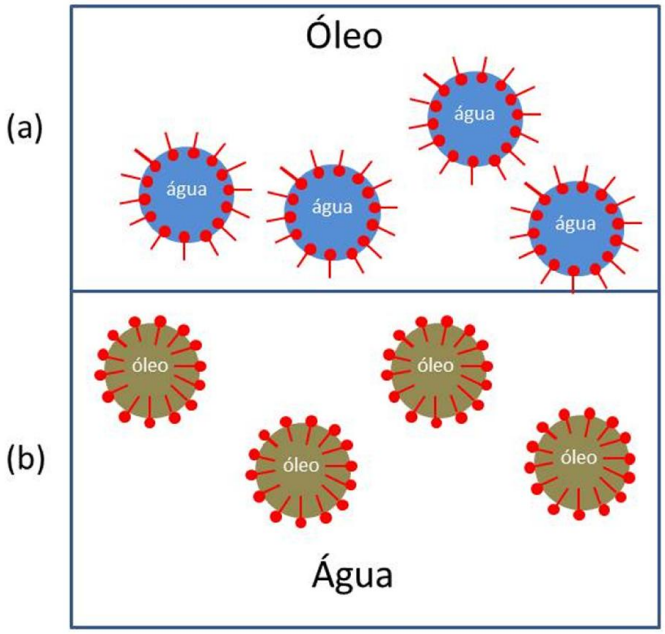

Figura 2-5 - Representação esquemática da formação de emulsões (a) água em óleo e (b) óleo em água

Baseado nesse comportamento descrito acima, os surfatantes possuem diversas propriedades interessantes para indústria, dentre elas, como: agente emulsificante, umectante, detergente, solubilizante e dispersante (MISHARA et al., 2009). Normalmente a principal característica de um surfatante é classificada pelo valor do HLB (sigla *Hidrofilic Lipofilic Balance)*, o qual de maneira simplificada pode ser definido como a relação entre a porção hidrofílica (solúvel em água) e a porção hidrofóbica (solúvel em óleo) do surfatante (DALTIN, 2011). A Tabela 2.2 exibe as principais características de um surfatante baseado em sua HLB.

Tabela 2-2 – Indicações de aplicações dos surfatantes de acordo com a faixa de HLB

Faixa de HLB	Aplicação mais comum
3-6	emulsificante de água em óleo
7-9	umectante
8-14	emulsificante de óleo em água
9-13	detergente
10-13	solubilizante
> 12	dispersante de sólido em água

Fonte: (DALTIN, 2011)

Neste contexto, torna se evidente que a seleção de um surfatante para um processo industrial esta diretamente relacionada à estrutura, estabilidade, e compatibilidade com as condições de utilização.

2.2 Biossurfatantes

Os BS compõe um diverso grupo de moléculas com atividade tensoativa sintetizada principalmente por micro-organismos (BANAT et al., 2010). Dentre os principais BS microbianos estão os glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos proteína-carboidratos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros. São compostos amfipático, ou seja, possuem uma parte hidrofóbica (longa cadeia de ácido ou hidróxi graxo de comprimento variável) e outra parte hidrofílica (aminoácido, ácido carboxílico, álcool, carboidrato, fosfato ou peptídeo). Eles são produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (BANAT et al., 2010). Dentre eles, as bactérias se destacam com maior número de espécies produtoras de BS, sendo grande parte isoladas de ambientes contaminados com petróleo ou resíduos industriais (MUKHERJEE e DAS, 2010).

O interesse pelos BS tem aumentado consideravelmente nos últimos, isso ocorre devido às inúmeras vantagens destes quando comparada aos surfatantes sintéticos, incluindo fácil degradação por micro-organismos, baixa toxicidade, biocompatibilidade, podem ser produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo, e

atividade estável frente a variações ambientais (temperatura, pH e força iônica, etc). (SEKHON, KHANNA e CAMEOTRA, 2012)

Aplicação destes compostos esta distribuída por diversos setores da indústria de alimentos, cosméticos, pesticidas, detergentes, fármacos, petróleo e biorremediação (SINGH, VAN HAMME e WARD, 2007).

É interessante destacar que tanto a função biológica quanto a aplicação industrial de BS seguem mecanismos semelhantes: enquanto os micro-organismos buscam adaptação produzindo BS para superar diferentes obstáculos à vida, o homem moderno também utiliza os BS ao solucionar problemas durante a geração de novas tecnologias. Portanto, não é possível descrever uma função única para essa classe de compostos, tanto para seu papel natural, quanto na indústria. Devido a grande diversidade de micro-organismos ainda não concebível, até o momento, uma explicação geral que descreva o papel natural dos BS. No entanto, os BS parecem estar naturalmente envolvidos em interações competitivas, em mecanismos de comunicação intercelular, no aumento da biodisponibilidade de substratos apolares e metais pesados, na motilidade, formação e manutenção de biofilmes (VAN HAMME, SINGH e WARD, 2006; LAWNICZAK et al., 2011; IBACACHE-QUIROGA et al., 2013). Os principais BS e suas aplicações estão em destaque na Tabela 2.3.

Tabela 2-3 – Principais BS produzidos por micro-organismos e suas aplicações.

BIOSSURFATANTE	MICRO-ORGANISMO	APLICAÇÕES	REFERÊNCIAS
Glicolipídeo			
Ramnolipídeos	*P. aeruginosa, P. chlororaphis, S. rubidea*	Biorremediação, antimicrobiano, MEOR	(NITSCHKE, COSTA e CONTIERO, 2005)
Soforolipídeos	*C.bombicola, C. antartica, T. petrophilum, C. botistae, C. apicola*	Antimicrobiano, antiviral, espermicida	(FELSE et al., 2007)
Trehalolipídeos	*Gordonia* sp., *Arthrobacter* sp. *Rhodococcus* sp.	Biorremediação, MEOR, farmacêuticas	(FRANZETTI, A. et al., 2010a)
Manosileritritol	*Pseudozyma siamensis, C. antartica*	Antifungo	(KITAMOTO et al., 1993)
Lipopeptídeos			
Viscosina	*P. fluorescens*	Antibiótico	(NEU, HARTNER e PORALLA, 1990)
Serrawetina	*S. marcescens*	Emulsificação de hidrocarbonetos	(LAI et al., 2009)
Surfactina / Iturina	*B. subtilis*	Antimicrobiano	(STANKOVIC et al., 2012)
Subtilisina	*B. subtilis*	Antimicrobiano	(SUTYAK et al., 2008)
Gramicidina	*B. brevis*	Antifungo	(SEDDON et al., 2000)
Fengicina	*B. subtilis*	Antimicrobiano	(CAO et al., 2011)
Liquenisina	*B. liqueniformis*	Antimicrobiano	(LI, YANG e MU, 2010)
Ácidos Graxos, lipídios neutros e fosfolipídios			
Ácido graxo / lipídeo neutro	*Marinobacter* sp.	emulsificador	(NAKANO et al., 2012)
Fosfolipídeos	*Acinetobacter* sp.	Biorremediação	(KOSARIC, 2001)
Surfatantes poliméricos			
Emulsan	*A. calcoaceticus*	*MEOR*	(CHOI, CHOI e LEE, 1996)
Biodispersan	*A. calcoaceticus*	Extração do calcário	(ROSENBERG et al., 1988)
Liposan	*C. tropicalis*	Emulsificador	(CIRIGLIANO e CARMAN, 1985)
Alasan	*A. radioresiistens*	Biorremediação de compostos poliaromáticos	(BARKAY et al., 1999)

Fonte: Adaptado de (NITSCHKE e PASTORE, 2002) e (SAHARAN, SAHU e SHARMA, 2012)

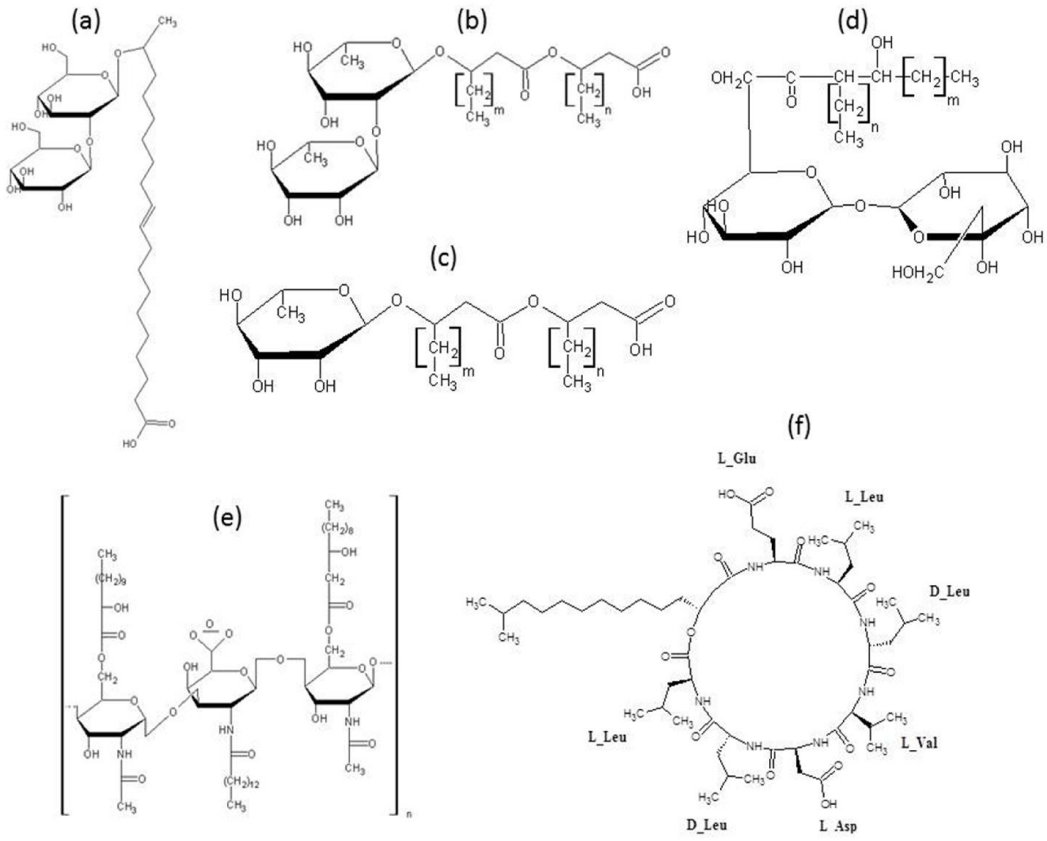

Figura 2-6 – Estrutura química de alguns dos principais BS (a) soforolipídeo; (b) mono-ramnolipídeos (Rha-C_m-C_n), (c) di-ramnolipídeo (Rha_2-C_m-C_n) onde m,n = 6-18; (d) trealolipídeo ; (e) emulsan e (f) surfactina

Os BS fosfolipídeos, glicolipídeos e lipopeptídeos são compostos de baixo peso molecular capazes de reduzir a tensão superficial da água para valores abaixo de 30 mN m^{-1} (ROSENBERG e RON, 1999).

Os glicolipídeos são compostos formados por uma cadeia de açúcar ligada a um ácido graxo. Os principais BS desta classe são os ramnolipídeos, soforolipídeos e trealolipídeos (ISLAS, MORENO E RODRIGUEZ, 2010).

Os ramnolipídios são produzidos e excretados por diversas bactérias principalmente por espécies do gênero *Pseudomonas*, em geral, quando cultivada em meio aquoso e fonte de carbono imiscível (NITSCHKE, COSTA e CONTIERO, 2005). Tipicamente são produzidos em meio de cultura como uma mistura de moléculas homólogas formadas por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a um ou dois ácidos graxos de cadeia alquil saturada ou insaturada entre C8 e C12 (Figura 2.6).

Normalmente as características do ramnolipídeos são influenciadas pelas espécies produtora, assim como pelas condições de cultivo (nutrientes, temperatura, pH, etc) (NITSCHKE, COSTA e CONTIERO, 2005). Os ramnolipídeos apresentam valores de HLB entre 4 e 6, tem alta capacidade para estabilizar emulsões em soluções aquosas, reduz a tensão interfacial hexadecano/água de 43 mNm^{-1} para valores menores que 1 mNm^{-1}, tensão superficial da água de 72 para valores abaixo de 30 mNm^{-1} e CMC entre 10 e 200 mgL^{-1} (ABDEL-MAWGOUD, LEPINE e DEZIEL, 2010; MULLER et al., 2012). Os ramnolipídeos são os BS mais estudados na literatura e com aplicações já disponíveis comercialmente, sendo que diferentes formulações de ramnolipídeos são disponibilizadas para variadas aplicações pela Rhamnolipid Incorporation (*www.rhamnolipid.com*).

Os Soforolipídeos são formados por dímeros de soforose ligado a longas cadeias de ácidos graxos, sendo produzido por micro-organismos como *Candida bombicola, C. antartica, C. botistae, C. apícola, Torulopsis bombicola e T. petrophilum* (DESAI e BANAT, 1997; FELSE et al., 2007). Os principais micro-organimos produtores são *Gordonia* sp., *Arthrobacter* sp., *Rhodococcus* sp. (FRANZETTI et al., 2010b).

Os Trealolipídeos são formados por um ácido β-hidroxicarboxílico (ácido mocólico) ligado a um dissacarídeo trealose, onde a estrutura e o grau de insaturação do ácido micólico são variáveis dependendo dos micro-organismos produtor.

Os fosfolipídeos consistem de ácidos graxos ligados a um grupo fosfato. Diversos micro-organismos como *Acinetobacter* sp. *Aspergillus* sp., e *Theobacillus theooxidans* tem sido relados como produtores de BS.

Entre os lipopeptídicos destacam-se os BS produzidos por *Bacillus subtilis*: surfactina (Figura 2.6), iturina e fengicina. Estruturalmente estes lipopeptídeos cíclicos são formados por sete (surfactina e iturina) a dez (fengicina) resíduos de aminoácidos unidos a uma cadeia de ácido graxo por ligação β-amino (iturina) ou β-hidróxi (surfactina e fengicina). O comprimento da cadeia de ácido graxo pode variar de C_{13}-C_{16} para a surfactina , de C_{14}- C_{17} para iturina e de C_{14} -C_{18} no caso da fengicina gerando os diferentes homólogos e isômeros para cada lipopeptídeo (ONGENA e JACQUES, 2008).

A surfactina de *Bacillus subtilis*, é considerada um dos BS mais efetivos, podendo reduzir a tensão superficial da água a 20°C de 72 mN m^{-1} para 27 mN m^{-1} em concentrações de 10 μM (PEYPOUX, BONMATIN e WALLACH, 1999; YOUSSEF et

al., 2004). A surfactina é considerada um tensoativo aniônico devido aos resíduos de ácido aspártico e glutâmico que em pH neutro apresentam carga negativa (SHEN et al., 2011). O seu caráter anfifílico se deve a presença da cadeia de ácido graxo e os aminoácidos hidrofóbicos (valina, leucina) que compõem sua estrutura. A CMC da surfactina foi calculada em 9,4 μmol L^{-1} quando em solução 0,1 mol L^{-1} de $NaHCO_3$ e pH 8,7 (ISHIGAMI et al., 1995) e forma micelas cilíndricas com número de agregação de aproximadamente 170 (HEERKLOTZ e SEELIG, 2001).

A iturina A é um lipopeptídeo neutro que apresenta TS de 45 mN m^{-1} e CMC de 40μM (SHAKERIFARD et al., 2009) podendo se agregar na forma de micelas ou lamelas quando em concentrações elevadas. Estruturalmente é formada por um heptapeptídeo contendo resíduos de asparagina, tirosina, glutamina, prolina e serina ligados cadeia de ácido graxo de C14-C15 (ONGENA e JACQUES, 2008).

A fengicina apresenta dez aminoácidos em sua estrutura sendo que três resíduos são carregados (dois ácidos glutâmicos e um resíduo de ornitina) resultando em caráter aniônico. É capaz de reduzir a TS da água para 43 mN m^{-1} e apresenta CMC de 6,25 μM (SHAKERIFARD et al., 2009).

Espécies de B. licheniformis produzem o BS liquenisina capaz de reduzir a tensão superficial da água para 27 mN m^{-1} e a tensão interfacial entre água/hexadecano para 0,36mN m^{-1} (LI, YANG e MU, 2010). *P. fluorescens* BD5 produziu dois BS denominados de pseudofactin I e II capazes de reduzir a tensão superficial da água para 31,5 mN m^{-1} com CMC de 72mg L^{-1} (JANEK et al., 2010).

Também existem alguns BS de alto peso molecular, dentre eles se destacam compostos poliméricos como o Biodispersan, emulsan, liposan, mannoproteína, entre outros complexos polissacarídicos. O Emulsan 378 produzido por *P fluorescens* é composto por 50% de carboidrato, 19,6% de proteína e 10% de lipídeo (ROSENBERG e RON, 1999), reduzindo a TS da água para valores abaixo de 30 mNm^{-1}, valores reduzidos de CMC e excelente atividade emulsificante podendo emulsionar hidrocarbonetos em água em concentrações da ordem de 0,001% (ROSENBERG e RON, 1999).

O alasan é complexo polissacaridico-protéico produzido por isolados de *Acinetobacter radioresistens* (NAVONVENEZIA et al., 1995). O liposan é um emulsificante extracelular produzido por *Candida lipolytica* composto por carboidratos e proteínas na proporção de 83% e 17% respectivamente. Os principais açúcares que

formam o liposan são: glicose, galactose, galactosamina e o ácido galacturónico (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985).

2.2.1 Produção de Biossurfatantes

A produção em larga escala de BS tem sido limitada pelo elevado custo de produção causado principalmente pela baixa eficiência em duas etapas do processo, biossíntese e purificação. Neste sentido, a pesquisa e desenvolvimento nessa área têm seguido as seguintes estratégias:

i) A utilização de substratos de baixo custo: é interessante destacar a diversidade metabólica dos micro-organismos, que os torna capazes de produzir BS em uma infinidade de substratos. Atualmente os resíduos industriais tem ganhado grande destaque na literatura como potencial fonte de substrato para produção de BS (COSTA, NITSCHKE e CONTIERO, 2008). É interessante destacar que cada região pode buscar nas características locais da indústria e agricultura substratos que apresentem o melhor desempenho e o menor custo para produção do BS.

ii) Isolamento e seleção do micro-organismo produtor: o planeta terra é imenso repositório de espécies de micro-organismos em constante evolução, o que torna infinita as possibilidade de encontrar novos BS com novas características improváveis de serem obtidas em compostos sintetizados em laboratório. Na vida microbiana, metabólitos são produzidos ou não e modificados de acordo com as necessidades do micro-organismo, o que torna infinita as possibilidades de encontrar novos compostos com características singulares para indústria. Muitas bactérias produtoras de BS têm sido isoladas de amostras de solo e água contaminadas com compostos orgânicos hidrofóbicos, como: resíduos de refinarias e áreas contaminadas por resíduos industriais (FERHAT et al., 2011; NAJAFI et al., 2011; CHEN et al., 2012; SYAKTI et al., 2013). Isso ocorre como uma estratégia de sobrevivência nesses ambientes pobres em fontes de carbono hidrofílicas – ao excretar BS no meio, o micro-organismo aumenta biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos. Atualmente pesquisas por micro-organismos de origem marinha tem tido grande destaque por produzir BS capazes de manter atividade em condições extremas de temperatura, pressão, pH e salidade – especialmente interessante para indústria química (BAHARUM, BENG e MOKHTAR, 2010; DAS et al., 2010)

iii) Otimização do meio de cultivo: Para otimização do processo de produção de BS é necessário que seja determinado a melhor combinação de diversos

fatores, dentre eles: a natureza e a quantidade da fonte de carbono, fonte de nitrogênio e demais fontes nutricionais, assim como as condições de cultivo como agitação, temperatura e pH (SAHARAN, SAHU e SHARMA, 2012).

iv) Processo separação e purificação: Esta etapa da obtenção do bioproduto pode representar até 60% do preço total de produção. Desde modo, inúmeros métodos têm sido desenvolvidos buscando, além de reduzir o custo, diminuir a utilização solventes orgânicos e geração de resíduos, influenciado pelos princípios da Química Verde (BOSCHEN, LENOIR e SCHERINGER, 2003; SAHARAN, SAHU e SHARMA, 2012).

v) Desenvolvimento de cepas superprodutoras, mutantes ou recombinantes para aumentar a produtividade: é possível aumentar a produção de linhagens selvagens a partir do desenvolvimento de cepas mutantes, esta tem sido uma estratégia encontrada para elevar o rendimento da produção dos BS mais bem estudados, surfactina e ramnolipídeo (KAAR et al., 2009; SATPUTE et al., 2010b)

2.2.2 Produção de BS utilizando micro-organismos marinhos

O oceano constitui o maior e mais rico bioma terrestre cobrindo cerca de 70% do globo terrestre e abrigando os mais diversos grupos de flora e fauna. Às condições de pressão, temperatura e salinidade que são expostos conferem aos micro-organismos marinhos capacidades metabólicas e fisiológicas únicas entre os seres vivos produzindo diferentes compostos inexistentes em organismos terrestres, logo representa uma grande fonte de novos compostos interessantes para indústria. Neste contexto, a produção de BS por micro-organismos marinhos tem sido amplamente estudada, a Tabela 2.4 reúne alguns micro-organismos marinhos identificados como produtores de BS.

Grande parte das bactérias marinhas descritas produzem heteropolissacarídeos com três ou quatro monossacarídeos distintos arranjados compostos por pentoses, hexoses, ácido úrico, amino açucares, grupos fostatos ou sulfatos (VAN DER MERWE et al., 2009).

O isolado *Pseudoalteromonas* sp. demonstrou capacidade de produzir um exopolímero com alta atividade emulsificante e tem sido utilizada em processos de remoção de metais de sedimento marinho (GUTIERREZ et al., 2008).

Yakimov et al. (1996) descreveu a produção de um BS glicolipídico pela bactéria marinha *Halomonadaceae* sp. MM1. Segundo o autor, o glicolipídeo produzido aumentou a biodisponibilidade do composto bifenol cloridrato e consequentemente a sua biodegradação.

Khopade et al. (2012a) descreveu a produção de um EPS produzido pela bactéria marinha *Nocardiopsis* sp. B4 com grande potencial para remediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos.

A espécie *A. calcoaceticus* RAG-1 foi isolado no Mar Mediterrâneo (REISFELD, ROSENBER e GUTNICK, 1972). O BS, Emulsan, produzido por esta espécie tem sido explorado comercialmente (ROSENBERG et al., 1979) e inúmeras aplicações foram patenteadas por Gutnick e colaboradores (SHETE et al., 2006) e comercializado pela Petrofirm Inc. para limpeza de reservatório contaminado com óleo, derramamentos de óleo e em processos de recuperação melhorada do petróleo (MEOR) (DESAI, PATEL E DESAI, 1994). Diferentes espécies de *Acinetobacter* produzem complexos heteropolissacarídeo que possuem propriedades surfactantes (KAPLAN e ROSENBERG, 1986). *A. calcoaceticus* A2 produz um heteropolissacarídeo chamado Biodispersan, este possui grande capacidade dispersante para compostos insolúveis em água e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, além disso a espécies tem grande tolerância ao sal tornando este composto viável para aplicações ambientais, especialmente em biorremediação de ambientes marinhos contaminados com óleo. *Acinetobacter* spp. são espécies amplamente presentes em ecossistemas marinhos, contribuindo de forma relevante para microflora em frutos-do-mar (AUSTIN et al., 1979; THAMPURAN e GOPAKUMAR, 1993; CHOI, CHOI e LEE, 1996). Espécies de *Acinetobacter* degradam com facilidade hidrocarbonetos e tem sido utilizado com frequência em processos de biorremediação (VANDYKE, LEE e TREVORS, 1991).

Espécies do gênero *Bacillus* sp. têm sido isoladas em ambientes marinhos extremos, em alta concentração salina e altas temperaturas. Cepas de *Bacillus* foram isoladas em águas da Ilha Vulcano (Ilhas Eolian, Italia) e mostram produtores de diferentes tipos de tetrassacarídeos extracelulares com atividade emulsificante (NICOLAUS et al., 2000; MAUGERI et al., 2002). Arena (2004) e Arena *et al.* (2006) relataram a produção de polissacarídeos termotolerantes por *B. Licheniformis* isolados também em águas próximas ás Ilhas Eolian. Mukherjee *et al.* (2009) relataram a produção de um lipopeptideo extracelular produzido por cepas de *B. circulans* isolados nas Ilhas Andaman e Nicobar, (India) que apresentou grande potencial antimicrobiano.

Espécies de *Brevibacterium* estão amplamente presentes em ambiente marinho e constitui um grupo de bactérias pouco exploradas para produção de agentes tensoativos. (KIRAN, THOMAS, et al., 2010) relataram a produção de um novo BS produzido por um isolado marinho de *Brevibacterium aureum* MSA13. Esta espécie produz um lipopeptídeo biossurfactante incomum de cadeia hidrofóbica, sendo composto por uma cadeia de ácido metil éster octadecanóico e um peptídeo de quatro aminoácidos, no entanto a completa caracterização química do composto ainda não foi publicada. Este composto demonstrou ter grande capacidade tensoativa e grande potencial para aplicação em ambientes marinhos, principalmente, em processos de recuperação melhorada de petróleo (MEOR). Kiran, Sabarathnam e Selvin (2010) estudaram a produção de biossurfactantes por cepas de *B. casei* isoladas em ambiente marinho de esponjas-do-mar *Dendrilla nigra*. O Glicolipídeo produzido apresentou ampla capacidade antimicrobiana, sendo caracterizado como um ótimo agente bacteriostático.

O trabalho de Khopade et al. (2012b) apresentou a produção de BS glicolipidico pela bactéria de origem marinha *Streptomyces* sp. O BS caracterizado apresentou CMC de 110 mg L^{-1} e TS de 29 mN m^{-1}.

O número de trabalhos relacionados à produção de BS a partir de micro-organismos marinhos esta em constante expansão (Tabela 2.4). Satpute et al. (2010a) faz uma extensa revisão sobre o estado da arte na pesquisa sobre BS de origem marinha.

Tabela 2-4 - Micro-organismos marinhos produtores de BS

Micro-organismo	Biossurfatante	Referência
P. nitroreducens	Lipopeptídeo	(DE SOUSA e BHOSLE, 2012)
Nocardia otitidiscaviarum	Glicolipídeo	(VYAS e DAVE, 2011)
Aspergillus	Ramnolipídeo	(KIRAN,, et al., 2010b)
Brevibacterium aureum	Lipopeptídeo	(KIRAN et al., 2010a)
Brevibacterium casei	Glicolipídeo	(KIRAN, SABARATHNAM e SELVIN, 2010a)
Nocardiopsis lucentensis	Glicolipídeo	(KIRAN, THOMAS e SELVIN, 2010b)
Marine bacterium	Fengicina	(SIVAPATHASEKARAN et al., 2009)
Nocardiopsis alba	Lipopeptídeo	(GANDHIMATHI et al., 2009)
Azotobacter chroococcum	Lipopeptídeo	(THAVASI et al., 2009)
Alcanivorax hongdengensis	Lipopeptídeo	(WU et al., 2009)
B. circulans	Lipopeptídeo	(MUKHERJEE et al., 2009)
Rhodococcus sp.	lipopeptídeo	(PENG et al., 2008)
Marine bacterium	Exopolissacarídeo	(KUMAR, MODY e JHA, 2007)

2.2.3 Aplicações dos BS

Inúmeras aplicações têm sido desenvolvidas para compostos tensoativos produzidos por micro-organismos (ISLAS, MORENO e RODRIGUEZ, 2010). Atualmente as principais aplicações dos BS concentram-se na biorremediação de áreas contaminadas (hidrocarbonetos e metais pesados), na indústria de petróleo, em particular na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) e na limpeza de tanques de transporte e armazenamento de óleo. Alguns BS também tem mostrado interessante potencial para aplicações nas áreas médicas e alimentícias, devido a diferentes propriedades biológicas como agente antimicrobiano, antiadesivo e antitumoral, além de apresentar baixa toxicidade (MUKHERJEE e DAS, 2010).

Os BS também encontram aplicações na agricultura apresentando atividade inseticida e herbicida. A surfactina apresentou grande eficiência no controle do mosquito *Anopheles mosquitoes* (GEETHA, PAILY e MANONMANI, 2012), propriedades larvicidas contra *Ephestia kuehniella* (GHRIBI et al., 2012), além de atuar

como emulsificante e dispersante na formulação de defensivos agrícolas do tipo organofosforado (PATEL e GOPINATHAN, 1986).

Estes compostos também tem mostrado potencial para aplicação em outras áreas como comésticos, higiene pessoal, detergentes, extração de minerais, fabricação de papel e agricultura (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000; SACHDEV e CAMEOTRA, 2013).

2.2.3.1 Biorremediação

O termo biorremediação refere-se a diversos processos que utilizam organismos vivos (plantas, algas, bactérias, etc...) para degradar, remover ou transformar compostos tóxicos em produtos metabólicos menos nocivos a vida. A biorremediação tem sido usada para completada transformação de compostos orgânicos em CO_2 e H_2O ou transformação de poluentes inorgânicos, reduzindo toxicidade, solubilidade e motilidade. Em geral, são utilizadas três estratégias em processos de biorremediação: a bioestimulação, ou seja, a adição de nutrientes e fatores críticos ao desenvolvimento da biota selvagem identificada como importante para o processo; a bioaumentação, que consiste na inserção de novos micro-organismos; e a adição de emulsificantes e surfactantes, os quais aumentam a biodisponibilidades de hidrofóbicos, acelerando a velocidade de degradação (KUMAR et al., 2011; TYAGI, DA FONSECA e DE CARVALHO, 2011; CHANDRA et al., 2013).

2.2.3.1.1 Biodegradação de hidrocarbonetos

A biodegradação de hidrocarbonetos por micro-organismos nativos é o mecanismo primário pelo qual hidrocarbonetos são removidos do meio ambiente, tal estratégia tem concepção muito antiga, no entanto, a sua aplicação em larga escala é recente. Atualmente constitui em umas das tecnologias de remediação mais utilizadas, principalmente pelo baixo custo envolvido, ser fundamentada em processos naturais e aplicável a uma grande variedade de contaminantes.

Os agentes tensoativo auxiliam a degradação liberando compostos adsorvidos ao solo e aumentando a solubilidade de compostos hidrofóbicos em água aumentando assim à biodisponibilidade e subsequentemente a biodegradação do hidrocarboneto (KUMAR et al., 2011). Manickam et al. (2012) descreveram o efeito da

adição de alguns BS para degradação do pesticida hexaclorocicloexano (HCH) mediado por *Sphingomonas* sp. Segundo o autor, a presença de BS como ramnolipídeo, trealolipídeo e soforolipídeo aumenta entre 3 a 9 vezes a solubilização de HCH em água e a biodegradação entre 30 a 50%. Reddy et al. (2010) mostraram que o isolado *Brevibacillus* sp. é eficiente na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), antraceno e fluoreno, concluindo que o glicolipídeo produzido e excretado pelo micro-organimo tem papel fundamental no mecanismo de captação do contaminante. Similarmente, a degradação de HPAs também tem sido relatada utilizando *Acinetobacter calcoaceticus* e *Rhodococcus rhodochrous* (KOLOMYTSEVA et al., 2009; Wong, Zhao e Zheng, 2011). Nestes trabalhos, a adição de surfactantes mostrou aumentar à assimilação e consequentemente a degradação do HPA fluoreno.

Bactérias do gênero *Gordonia* tem sido descritas em diversos processos de biorremediação. Franzetti et al. (2009) descreveu que a produção de dois tipos de tensoativos, bioemulsan e trealolipídeo, por *Gordonia* sp., estes parece ter papel fundamental em um mecanismo singular de captação de compostos insolúveis em água. Durante a fase inicial de crescimento a bactéria interage diretamente com o substrato apolar por intermédio da superfície hidrofóbica da sua parede celular, em uma segunda fase, após a produção do bioemulsificante, a superfície celular reduz a sua hidrofobicidade espalhando-se por todo substrato hidrofóbico pseudosolubilizado/bioemulsificado. O BS ligado à superfície celular permite ao micro-organismo ligar-se a superfície externa da emulsão, estabilizada pelo bioemulsan, para interagir com os hidrocarbonetos (FRANZETTI et al., 2008). O exopolissacarídeo produzido por *Gordonia alkanivorans* mostrou aumentar a biodegradação de diesel por outros micro-organismos (TA-CHEN, CHANG e YOUNG, 2008). Caredda et al. (2009) também relataram a grande eficiência do uso do bioemulsan produzido por *Gordonia* sp. como agentes de lavagem para remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Saeki et al. (2009) estudaram a utilização do BS produzido pelo isolado *Gordonia* sp. em processos de biorremediação em ambientes marinhos contaminados com petróleo. A aplicação deste BS mostrou agir como dispersante reduzindo a quantidade de contaminantes na superfície da água, esta propriedade por ser importante para reduzir os impactos causados sobre pássaros e mamíferos marinhos.

Espécies produtoras do BS ramnolipídeo exibem capacidade de degradar inúmeros poluentes orgânicos como os pesticidas (DDT, DDD e Dieldrin e diclorodifenildicloroetano) e derivados de petróleo (PACWA-PLOCINICZAK et al.,

2011; KASEMODEL, PORTO E NITSCHKE, 2012; KASEMODEL et al., 2012; VAIDEHI e KULKARNI, 2012; ZHANG et al., 2012; ZHU et al., 2012). Alguns estudos indicaram que a produção de poli-hidroxialcanos (PHA) aumenta a capacidade de adaptação de algumas bactérias a situações de estresse ambiental, desta forma, quando presente em um ambiente com substâncias hidrofóbicas tende a aumentar a produção de BS (GUMEL, ANNUAR e HEIDELBERG, 2012; Narancic et al., 2012; TRIBELLI et al., 2012)

A utilização consórcios bacterianos para biodegradação se aproximam mais de uma situação real, neste sentido Plaza et al. (2008) estudaram a biodegradação de hidrocarbonetos presentes em água contaminada com petróleo pelo consórcio bacteriano *Ralstona piketti* SRS, *Alcaligenes piechaudii* SRS, *Bacillus subtilis* sp. e *Bacillus sp*.. Este consórcio degradou 91% dos hidrocarbonetos em 30 dias de experimento, além de reduzir significantemente a toxicidade do efluente. Kaczorek e Olszanowski (2011) relataram a degradação de hidrocarbonetos pelo consórcio bacteriano *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., onde a adição do BS saponina mostrou-se mais eficiente que surfatante sintético Triton-100 na bioestimulação do processo.

Em resumo, em processos de biorremediação é possível utilizar tanto uma bactéria produtora de BS, como a aplicação de um BS externo que facilite a captação dos poluentes por bactérias que não possuem a capacidade de produzi-los.

2.2.4 Produção de BS utilizando substratos de baixo custo

Atualmente a aplicação comercial dos BS é limitada devido baixa competitividade econômica frente aos surfatantes sintéticos (FOLEY et al., 2012). Umas das principais estratégias de tornar os BS viáveis economicamente constitui na utilização de matérias-primas de baixo custo, já que estas representam cerca de 30 % do gasto total de produção (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Nesse sentido o uso de substratos alternativos tem ganhado cada vez mais destaque em estudos de produção de BS (Tabela 2.4).

Estudos utilizando glicerol (1,2,3 – Propanotriol) vêm sendo recorrente na produção de BS, este composto constitui em um subproduto da produção de biodiesel e amplamente disponível. Esta molécula pode ser facilmente absorvida pela célula por difusão e convertido em glicose, via gliconeogênese, ou oxidado para produção de

energia via glicólise e ciclo de Krebs (ROBERGS e GRIFFIN, 1998). Além disso, a produção mundial de biodiesel ultrapassou a marca de 16 milhões de toneladas em 2010 gerando algo em torno de 1,8 milhão de tonelada de glicerol (LAMERS, 2011; KHANNA, GOYAL e MOHOLKAR, 2012).

Neste contexto, Sousa et al. (2012) relataram a produção de surfactina por B. subtilis utilizando subproduto da produção de biodiesel altamente impuro, o composto obtido foi capaz de reduzir a TS da água para 27 mN m^{-1}.

Saikia et al. (2012) descreveram a produção de ramnolipídeo por P. aeruginosa a partir de glicerol na concentração de 6,3 g L^{-1} produzindo 0,8 g L^{-1} de BS. O tensoativo produzido apresentou CMC de 90 mg L^{-1} e redução da TS do meio para 26 mN m^{-1}.

De Faria et al. (2011) estudaram a produção do BS fengicina por *B. subtilis* utilizando glicerol como substrato, os resultados demonstraram que o biotensoativo foi capaz de reduzir a TS do meio para 31 mN m^{-1} em 72 h de fermentação.

Alguns óleos vegetais, geralmente resíduos, também estão sendo avaliados como fonte de carbono para processos biológicos de produção de tensoativos (LIU et al., 2011; VEDARAMAN e VENKATESH, 2011; GEORGE e JAYACHANDRAN, 2013). Nitschke, Costa e Contiero, (2010) utilizaram resíduo de óleo de soja para produção de ramnolipídeo por *P. aeruginosa*, o tensoativo gerado exibiu CMC entre 100 e 125 mg L^{-1} e TS de 29 mN m^{-1}.

Camilios-Neto et al. (2011) relataram a produção de BS por P. aeruginosa por fermentação em estado sólido usando uma mistura de bagaço de cana-de-açucar, farelo de milho, glicerol e óleo de soja.

Em um contexto onde produtos sustentáveis ganham cada vez mais espaço no mercado, pesquisa por novas matérias-primas renováveis ou de reutilização de resíduos tem grande incentivo da indústria, universidades e agências de fomento. A Tabela 2.5 reúne alguns dos substratos de baixo custo utilizados em estudos de produção de BS.

Tabela 2-5 – Principais substratos de baixo custo utilizado na produção de BS

Substrato	Micro-organismo	Biossurfatante	Referência
Glicerol	*B. subtilis*	surfactina	(SOUSA et al., 2012)
Glicerol	*B. subtilis*	fengicina	(DE FARIA et al., 2011)
Glicerol	*P. aeruginosa*	ramnolipídeo	(SAIKIA et al., 2012)
Efluente da produção de óleo de oliva	*P. aeruginosa*	ramnolipídeo	(SIDAL e OZKALE-TASKIN, 2003)
Resíduo de óleo de coco	*P. aeruginosa*	ramnolipídeo	(GEORGE e JAYACHANDRAN, 2013)
Etanol	*P. aeruginosa*	ramnolipídeo	(MATSUFUJI, NAKATA e YOSHIMOTO, 1997)
Óleo de milho	*C. bombicola*	soforolipídeo	(PEKIN, VARDAR-SUKAN e KOSARIC, 2005)
Óleo de canola	*C. bombicola*	soforolipídeo	(DANIEL, REUSS e SYLDATK, 1998)
Soro de leite	*B. licheniformis*	lipopeptídeo	(GOMAA, 2012)
Bagaço da Uva	*Actobacillus pentosus*	lipopeptídeo	(RIVERA et al., 2007)
Efluentes de cervejaria	*B. mycoides*	lipopeptídeo	(NAJAFI et al., 2011)
Melaço e manipueira	*B. subtilis*	surfactina	(NITSCHKE, FERRAZ e PASTORE, 2004)
Suco de caju	*B. subtilis*	surfactina	(FREITAS DE OLIVEIRA et al., 2013)
Resíduo de óleo de cozinha	*Starmerella bombicolla*	soforolipídeo	(WADEKAR et al., 2012)
Resíduos de óleo de motor	*Corynebacterium kutscheri*	glicolipídeo	(THAVASI et al., 2007)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Selecionar bactérias marinhas produtoras de biossurfatantes

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar a produção dos BS a partir de diferentes fontes de carbono;
- ✓ Identificar os micro-organismos produtores de BS;
- ✓ Estudar a produção dos BS nas fontes de carbono selecionadas;
- ✓ Investigar o potencial de aplicações em biorremediação de petróleo e emulsificação em diferentes susbstâncias hidrofóbicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seleção dos micro-organismos produtores foi realizada em três etapas (Figura 4.1). 1ª etapa: Teste de produção com 59 isolados, 2ª etapa: com os isolados que apresentaram atividade emulsificante, a produção do BS foi avaliada em intervalos de tempo cultivo de 6 horas, 3ª etapa: cinética de produção dos isolados selecionados.

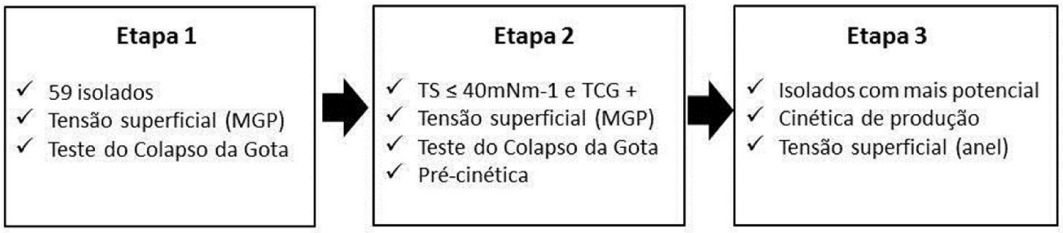

Figura 4-1 – Representação simplificada das fases de seleção dos micro-organismos.

4.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram isolados a partir de amostras de algas e invertebrados marinhos coletados em 2005 no litoral paulista e mantidos no acervo de pesquisa da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP, no âmbito de projeto temático desenvolvido em conjunto com o IQSC (projeto Fapesp 05/60175-2) (MENEZES *et al.*, 2010). As bactérias foram preservadas por ultracongelamento a -80^{o}C e reativadas em meios de cultura específicos de acordo com as necessidades nutricionais de cada grupo de bactéria (TSA, GPY, ágar marinho e ágar M1). Em preparados com água do mar artificial, foram testados 59 isolados bacterianos quanto à capacidade de produção de BS.

4.2 Composição dos meios de cultivo

Os 4 meios de cultivo utilizados nos procedimentos experimentais apresentavam, cada um, as seguintes composições:

Água do mar artificial (g L^{-1}): KBr 0,1; NaCl 23,48; $MgCL_2$ 10,61; KCl 0,66; $SrCL_2.6H_2O$ 0,04; Na_2SO_4 03,92; $NaHCO_3$ 0,19; H_3BO_3 0,03; $CaCL_2.2H_2O$ 0,147 ; H_2O destilada 1,0 L (MENEZES *et al.*, 2010).

Meio de cultura GPY (Glucose peptone yeast extract Agar)(g L^{-1}): Glicose 1; peptona de carne de soja 0,5; extrato de levedura 0,1; agar 15.

Agar M1 (g L^{-1}): amido solúvel 10; peptona 2; extrato de levedura 4; ágar 15.

Agar Marinho: caldo marinho 2216 Zobell, composição (g L^{-1}): digestão péptica de tecido animal 5; $MgCl_2$ 8,8; $SrCl_2$ 0,034; extrato de levedura 1; NaHCO3 0,16; KBr 0,08; NaCl 19,45; KCl 0,55; NaF 0,0024; NH_4NO_3 0,0016; Na_2HPO_4 0,008; H_3BO_3 0,022; citrato férrico 0,1; Na_2SO_4 3,24; $CaCL_2$ 1,8; Na_2O_3Si 0,004.

4.3 Seleção dos micro-organimos produtores de BS

Foram testados 4 fontes de carbono, duas de natureza hidrofílica (sacarose e glicerol) e duas de natureza hidrofóbica (óleo de soja e vaselina), considerando que alguns micro-organismos são capazes de produzir BS em fontes de carbono hidrofílicas enquanto outros apenas na presença de fontes hidrofóbicas (RAHMAN e GAKPE, 2008).

As culturas bacterianas mantidas em geladeira foram transferidas para tubo inclinado contendo meio de cultura específico em água do mar artificial (TSA, GPY, Agar marinho e Agar M1) e incubados em estufa 30^oC por 24 horas. Uma alça de cultura 24 horas foi transferida para erleymeyer de 125 mL contendo 25 mL de água do mar artificial; 0,125 g (0,5%) de NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio e de 0,5 g (2%) da fonte de carbono a ser testada (sacarose, glicerol, óleo de soja e vaselina líquida). O pH do meio foi ajustado para 7,5 ± 0,2. Os ensaios foram realizados em agitador tipo *shaker* a 150 rpm, temperatura de 30^oC durante 5 dias. Após incubação, o meio de cultivo foi submetido a centrifugação (10.000 *g*) por 15 minutos para remoção das células e o sobrenadante foi utilizado para realizar os testes de atividade tensoativa. A Figura 4.2 exibe um resumo dos reagentes e procedimentos utilizados neste experimento.

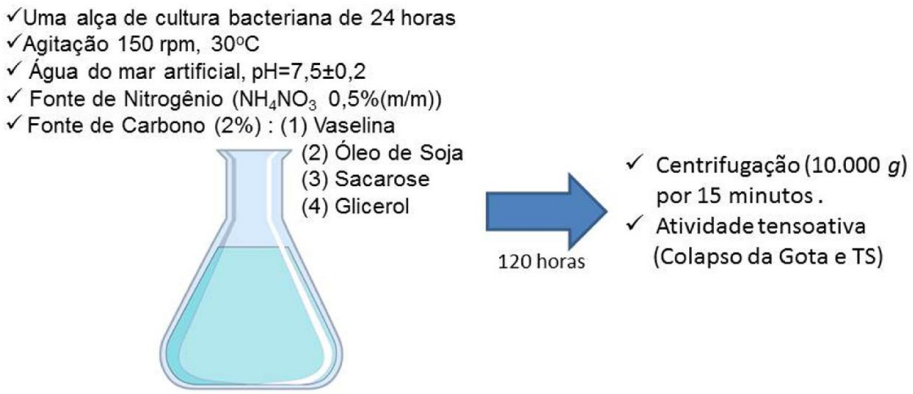

Figura 4-2 – Procedimentos e reagentes utilizados na seleção dos micro-organismos

Após a seleção preliminar foi um realizado acompanhamento cinético (pré-cinética) onde a produção foi acompanha em intervalos de 6 horas utilizando medidas de Tensão superficial (MGP) e o teste do colapso da gota.

4.3.1 Técnicas Analíticas

4.3.1.1 Determinação da atividade tensoativa

A presença de atividade tensoativa foi determinada por dois métodos: método do colapso da gota e tensão superficial. Os resultados analisados pelo software Attension Sigma 700.

4.3.1.1.1 Método do colapso da Gota (MCG)

Preencheu-se cada cavidade de uma microplaca de poliestireno (96 cavidades) com 7 μL de óleo lubrificante de motor (Luma 100 – Luma óleos industriais), manteve-se esta amostra por 24 h em temperatura ambiente. Posteriormente uma gota (20 μL) do sobrenadante da cultura foi cuidadosamente adicionada sobre a camada de óleo. Após 1 min as gotas foram observadas determinando-se a presença de colapso que é indicativo de atividade tensoativa (TUGRUL e CANSUNAR, 2005).

4.3.1.1.2 Determinação da tensão superficial

A medida da tensão superficial é considerada o teste mais sensível e direto para detecção de atividade tensoativa.

4.3.1.1.2.1 Método da Gota pendente (MGP)

Na primeira fase de seleção de micro-organismos foi utilizado o método da gota pendente (Hansen e Rodsrud, 1991) utilizando um medidor de ângulo de contato e tensão superficial KSV CAM 101 (Figura 4.3) disponível no laboratório de polímeros do Instituto de Física de São Carlos (IFSC).

O método da gota pendente consiste na formação de uma gota através de um tubo capilar (microsseringa), onde uma câmera é utilizada para capturar a imagem da gota formada e um *software* calcula a tensão superficial entre as duas fases (fase da gota e fase no qual a gota esta imersa). Para isso, a tensão superficial/interfacial de um liquído pode ser relacionada ao formato da gota pela seguinte equação: $\gamma = \Delta\rho \, . \, g. \, R_0^2 / \beta$, onde $\Delta\rho$ = diferença de densidade entre os fluidos da interface, g = constante gravitacional R_0 = Raio da curvatura da gota no ápice de romper a estrutura, β = é uma constante definida através da equação de Young-Laplace descrita na Figura 4.4a (HANSEN e RODSRUD, 1991).

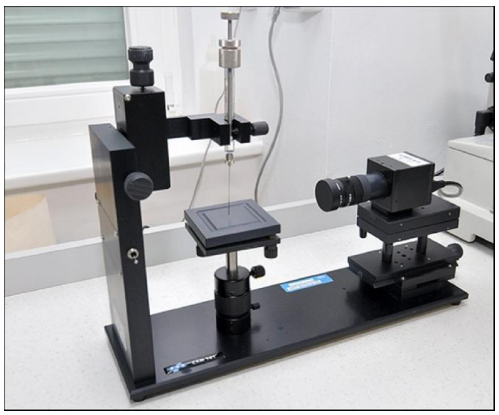

Figura 4-3 - Medidor de ângulo de contato e tensão superficial KSV CAM 101
Fonte: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, v.v.i

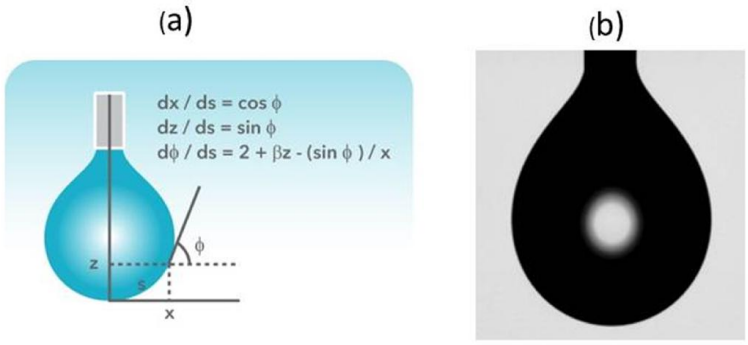

Figura 4-4 – Método da gota pendente (a) Modelo teórico para o calculo da tensão superficial e (b) imagem experimental da gota pendente.
Fonte: (Attension)

4.3.1.1.2.2 Método Du Nouy Ring (MDNR)

Na segunda fase de seleção dos micro-organismos foi utilizado o método anel de *Du Nouy* (HUH e MASON, 1975; LUNKENHEIMER, 1989). As amostras que apresentaram tensão superficial < 40 mN/m foram selecionadas para estudos posteriores (HABA et al., 2000).

Este método utiliza a interação entre um anel de platina e a superfície a ser testada (Figura 4.5). O calculo da tensão superficial/interfacial é baseado na medida do máximo de força aplicado pela superfície ao anel.

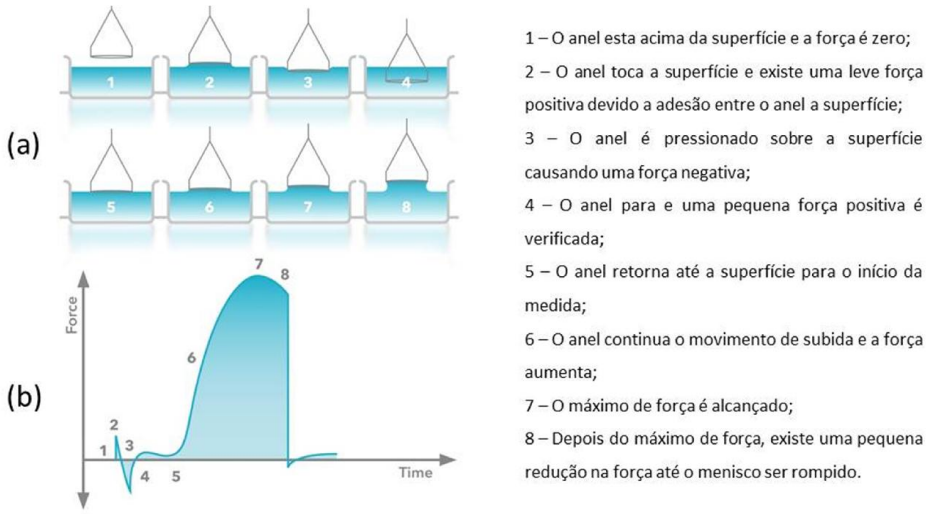

Figura 4-5- Representação esquemática do método *Du Nouy Ring:* (a) interação do anel com a superfície durante o experimento e (b) variação da força aplicada pela superfície sobre o anel durante o experimento.
Fonte: (Attension)

4.3.1.2 Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (DO)

A medida de turbidez de uma cultura microbiana é o método mais simples e rápido de estimar a concentração celular. Neste método um feixe de luz (λ = 610 nm) focado numa suspensão microbiana é parcialmente desviado pelas células, e a porcentagem de luz não-desviada (transmitância, T) é medida por um espectrofotômetro. A densidade óptica (DO) corresponde à absorbância e é calculada pela equação : DO = log (I_0/I), onde I_0 corresponde a quantidade de luz incidente e I a quantidade de luz transmitida através da amostra. A quantidade de luz que atravessa a suspensão celular é proporcional à quantidade de células (vivas ou mortas) e do tamanho das células,

Entretanto, este método não é capaz de distinguir células viáveis (vivas) de células mortas e de emitir valores absolutos da concentração de células. Para solucionar esta deficiência é construída uma curva de padronização correlacionando este método com outro capaz de quantificar o número de células viáveis (Figura 4.6). Dessa forma é possível utiliza a DO com razoável confiança para acompanhar o crescimento celular de uma cultura microbiana.

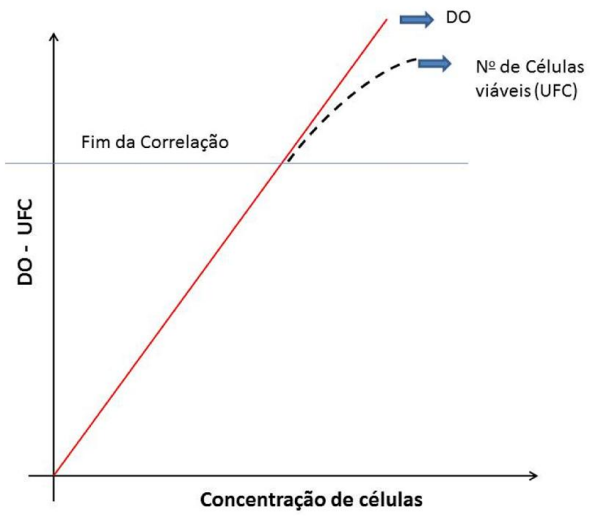

Figura 4-6 - Representação esquemática da correlação entre um método direto (contagem de colônias – UFC) e método indireto (DO) de medida de concentração celular microbiana. Fonte: (SOARES e RIBEIRO, 2002)

4.3.1.3 Método de diluição seriada e contagem de colônias

Uma alíquota de 1 mL do meio de cultivo foi retirado e diluído em solução salina estéril 0,86% em diferentes concentrações (1:10, $1:10^2$, $1:10^n$) sob forte agitação em vortex a cada diluição. Em seguida alíquotas de 20 µL de cada tubo foram colocadas na superfície de placas contendo o meio de cultura especifico para o micro-organismo. Após incubação em estufa a 30°C, o número de colônias presentes em cada gota foi contado e expresso em UFC/mL (MILES e MISRA, 1938) (Figura 4.7).

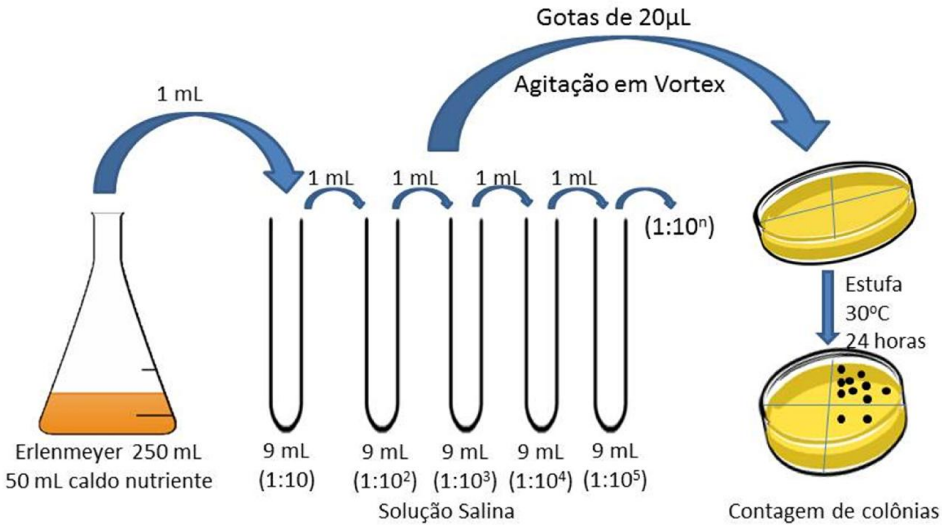

Figura 4-7 – Representação esquemática do método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

4.3.1.4 Concentração micelar Crítica (CMC)

A determinação da CMC foi realizada medindo-se a tensão superficial de diferentes diluições da solução do extrato bruto de BS. O Software Attension Sigma 700 constrói uma curva Tensão superficial *versus* [surfatante] (Figura 4.8) e calcula a CMC..

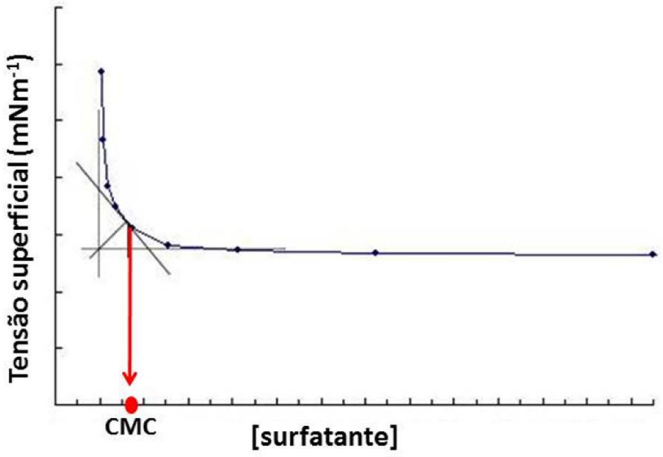

Figura 4-8 - Determinação da CMC através de adições sucessivas de surfatante

4.3.1.5 Diluição Micelar Crítica (CMD)

Amostras dos meios de cultura centrifugados foram diluídos 10 x (CMD^{-1}) e 100 x (CMD^{-2}) em água destilada, sendo as tensões superficiais das respectivas diluições determinadas conforme descrito no item 4.3.1.1.

4.3.1.6 Quantificação de proteínas (Método de Lowry)

Devido à presença de compostos imiscíveis no meio de cultivo como óleo vegetal e hidrocarbonetos foi utilizado um método indireto para acompanhar o crescimento celular, utilizando o método de Lowry - Hartree (LOWRY et al., 1951; HARTREE, 1972).

Foram utilizados os seguintes reagentes e procedimentos:

- ✓ Solução A: Na_2CO_3 0,8mL^{-1} em NAOH 0,1 mol L^{-1}
- ✓ Solução B: $CuSO_4.5H_2O$ 0,04 mL^{-1}
- ✓ Solução C: Tartarato sódio-potássio 0,07 mol L^{-1}
- ✓ Reagente Folin- ciocaulteau diluído em água na proporção 1:1

No momento da análise as soluções A, B e C foram misturada na proporção 2:1:1. Em seguida foram adicionados 5 mL da solução ABC em tubos contendo 1 mL da amostra a ser analisada e mantido em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, 0,5 mL de reagente de Folin-ciocaulteau foi adicionado aos tubos e mantido em

repouso por mais 30 min. Logo após, foram realizadas medidas de espectrofotometria UV-Vis em λ = 660 nm. Por fim, foi utilizada Albumina bovina para construção de uma curva padrão de análise de proteínas (absorbância *versus* [proteína]).

4.4 Identificação dos isolados microbianos selecionados

A identificação dos isolados produtores de BS foi realizada por meio de taxonomia convencional (análises macro e microscópicas) e molecular (sequenciamento de genes ribossomais e análise filogenética). Esta etapa foi realizada no CPQBA/Unicamp.

4.4.1 Taxonomia convencional

As bactérias foram analisadas por observação macroscópica (forma, coloração) e microscópica (morfologia da célula, arranjo celular, motilidade e teste de Gram) visando a separação de grupos fenotípicos distintos.

4.4.2 Taxonomia molecular

A identificação por taxonomia molecular foi realizada através análise das sequências de DNAr 16S. A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por (POSPIECH e NEUMANN, 1995). A amplificação foi feita pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído das amostras, com a utilização dos *primers* p27f (LANE, 1991) e 1401r (HEUER et al., 1997), homólogos a regiões conservadas do gene RNA ribossomal 16S das bactérias. Os produtos de amplificação foram purificados em mini-colunas (GFX PCR DNA and *gel band purification* kit, GE *Healthcare*) e sequenciados em sequenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). Para as reações de sequenciamento foi utilizado o *kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Healthcare), utilizando os *primers* p10f, p765f, p782r e p1100r para o DNAr 16S das bactérias.

As sequências parciais obtidas com cada primer foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa phredPhrap e comparadas com as sequências dessas mesmas regiões do *operon ribossomal* de organismos representados na base de dados do Genbank (http://www.ncbi.nem.nih.gov) e RDP (http://rdp.cme.msu.edu/). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo alvo foram recuperadas das bases de dados para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e as análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), onde o modelo de (M, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo neighbor-joining (NJ) foi utilizado para as reconstruções filogenéticas, com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 replicatas.

4.5 Cinética de produção dos BS

Os isolados que apresentaram os menores valores de tensão superficial e a respectiva fonte de carbono foram avaliados quanto à cinética de produção de BS visando estudar a relação entre o crescimento celular e acúmulo de produto, bem como a obtenção de maior quantidade de produto para as etapas posteriores.

4.5.1 Curva de crescimento

O isolado bacteriano foi retirado do estoque e repicado em meio de cultivo específico. Após 24 h, uma alça foi transferida para um tubo de ensaio e através de diluições com solução salina o valor de DO foi ajustado para 0,5. Em seguida 1 mL desta suspensão foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura específico e incubado em agitador rotatório à 150 rpm, 30°C até o ciclo de crescimento atingir a fase estacionária. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em tempos regulares para construir o perfil da curva de crescimento celular. Para isso, foram realizadas medidas de DO e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método DSCC descrito no item 4.3.1.3 (MILES e MISRA, 1938). O objetivo foi determinar o tempo de cultivo necessário para atingir o final da fase log de crescimento, ou seja, o

momento em a concentração relativa de células jovens atinge o seu máximo e ponto onde o inóculo deve ser retirado.

4.5.2 Processo de produção para avaliação cinética

Para iniciar a produção do BS, 4 mL inóculo preparado anteriormente (item 4.5.1) foi transferido para um erleymeyer de 250 mL contendo 46 mL de água marinha artificial; 0,250 g (0,5%) de NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio e de 1,0 g (2%) da fonte de carbono selecionada (sacarose, glicerol, óleo de soja e vaselina líquida). O pH do meio foi ajustado para 7,5 ± 0,2 e incubados em agitador tipo *shaker* a 150 rpm, 30^{o}C durante 5 dias. Todo o procedimento esta resumido na Figura 4.9. Todos os pontos de medidas foram realizados em triplicata como forma de minimizar os erros analíticos.

Durante o cultivo/produção foram retiradas alíquotas para a realização das seguintes análises:

- Acúmulo de BS: foi evidenciado pela medida de tensão superficial e diluição micelar crítica (CMD) de amostras do meio de cultivo após remoção das células por centrifugação a 10.000 *g*, 15 minutos (itens 4.3.1.1.2 e 4.3.1.5).

- Crescimento celular: foi utilizado o método de Lowry de quantificação de proteínas como medida indireta do crescimento bacteriano (item: 4.3.1.6).

- Medidas de pH (pHmetro de Bancada de ORP/Temperatura - Modelo HI 2221)

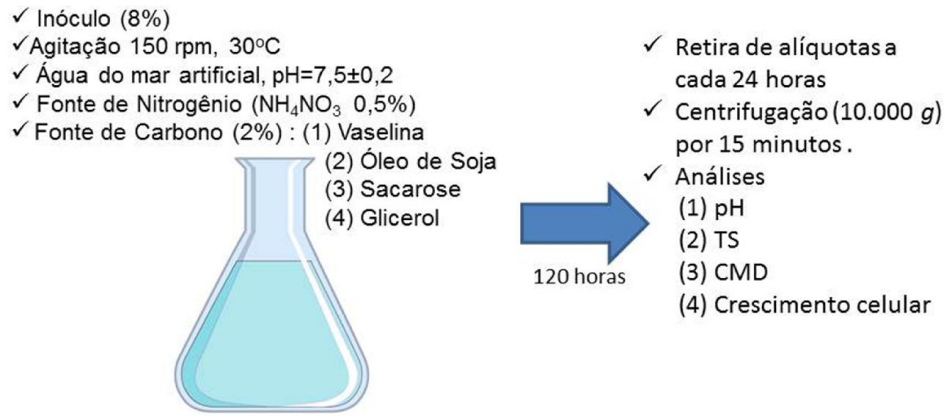

Figura 4-9 - Procedimentos e reagentes utilizados nos experimentos da cinética de produção do BS

4.6 Produção dos Biossurfatantes

Os experimentos para produção do BS foram conduzidos conforme descrito no item 4.5.2 utilizando frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura e a fonte de carbono selecionada. O tempo ótimo de produção foi estabelecido através da análise cinética da produção.

4.7 Extração dos Biossurfatantes

Os compostos tensoativos foram extraídos a partir do meio de cultivo após remoção das células por centrifugação (10.000 *g* , 20 min). Foi selecionado o método de extração mais eficiente para cada um dos micro-organismos selecionados.

Método 1: Precipitação Ácida

O pH do sobrenadante foi ajustado para 2,0 através da adição de HCl concentrado e mantido a 4^{o}C por 24 h. Foi observada a formação de precipitado e a sua separação foi realizada através da centrifugação à 10.000 *g* por 20 min, o produto foi deixado em estufa a 50^{o}C por 12 horas, sendo essa massa considerada como extrato bruto contendo BS (HEYD et al., 2008).

Método 2: Extração líquido-líquido

As células bacterianas e o meio de cultivo separado por centrifugação foram utilizados para extração com solvente: as células bacterianas devidamente secas em estufa 40^{o}C foram dissolvidas em clorofórmio-metanol (2:1) e posterior evaporação do solvente em rotaevaporador. Por fim, o produto foi levado a secura em estufa a 60^{o}C. Parte do produto foi dissolvido em água para medição da atividade tensoativa; o meio de cultivo foi misturado a n-butanol na proporção 2:1 e posterior evaporação do solvente em rotaevaporador. Em seguida, o produto foi levado a secura em estufa a 60^{o}C. Parte do produto foi dissolvido em água para medição da atividade tensoativa. Ao final as duas partes foram reunidas em clorofórmio e colocada em estufa à 50^{o}C até secagem completa, este produto foi utilizado como extrado do BS utilizado posteriormente. Metodologia adaptada de (FRANZETTI et al., 2009).

Método 3: Precipitação com acetona

Ao sobrenadante foi adicionado acetona na proporção 3:1 (acetona/sobrenadante) e mantido em repouso por 24 h à 4^{o}C. Em seguida, o precipitado foi separado da fase aquosa por meio de centrifugação à 10.000 *g* por 20 min, o produto foi deixado em estufa a 50^{o}C por 12 h. O precipitado seco foi dissolvido em isopropanol na proporção de 1 ml de solvente para cada 1mg de precipitado e levado ao rotaevaporador até secagem completa. O precipitado resultante foi considerado como extrato bruto contendo BS (CIPINYTE et al., 2011).

4.8 Caracterização físico-química dos BS

O produto obtido foi dissolvido em água destilada (0,1%) e submetido as seguintes análises:

-Determinação da Tensão Superficial e CMC: a Tensão superficial e a CMC foram aferidas utilizando o aparelho Attension Sigma 700 pelo método Du Nouy**.**

-Determinação da Tensão Interfacial: a medida da tensão interfacial utilizando o aparelho Attension Sigma 700 pelo método Du Nouy**.** As medidas foram realizadas com extrato bruto do BS na concentração 0,1% (m/v) contra hexadecano como meio imiscível.

4.9 Caracterização estrutural preliminar

4.9.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTF)

As amostras para determinação por espectrometria de infravermelho foram preparadas segundo a técnica de (O'CONNOR, DUPRÉ e MITCHAN, 1958), utilizando-se um Espectrofotômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) marca/m*odelo:* Bomem/MB-102 e pastilhador de parafusos. Foi utilizada a resolução de 4 cm^{-1} na faixa de 500 – 4000 cm^{-1} e 32 *scans*. As amostras solidas (surfactina, BS produzido por *Brevibacterium* sp. e *Arthrobacter* sp.) foram analisadas em pastilha de KBr montadas em pastilhador parafuso. As amostras líquidas ou gel (Ramnolipídeo e BS produzido por *Gordonia* sp.) foram analisadas em filme fino

depositado sobre uma janela (pastilha) de silício (silicon wafer). O Gel extrato com BS foi dissolvido em metanol e gotejado sobre a face de um cristal de silício (silicon wafer), após a evaporação do solvente, forma-se um filme contendo BS.

4.9.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Foram aplicados 4 mL de amostra com o auxílio de uma micro-seringa sobre cromatoplacas de sílica gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV_{254}).

As corridas foram desenvolvidas em acetonitrila/metanol/n-butanol/H_2O (60:20:5:2) . Após a eluição, os *spots* foram revelados com:

- Vapor de Iodo sublimado para identificação de lipídeos;

- Ninhidrina para identificação de aminoácidos e polipeptídios: a solução contendo etanol, ninhidrina na proporção (99:1) foi pulverizada sobre a placa cromatográfica e em seguida levada para estufa a 100^{o}C até o aparecimento das bandas;

- α-naftol para identificação de açucares: a solução contendo α-naftol 2,4%(m/v), ácido sulfúrico 10% (v/v) e etanol 80% foi pulverizada sobre a placa cromatográfica e em seguida levada para estufa a 120^{o}C até o aparecimento das bandas;

4.10 Aplicações

Foram investigadas a atividade emulsificante e o potencial de remediação de areia contaminada com petróleo.

4.10.1 Atividade emulsificante

Em um tubo de ensaio com tampa rosca foram adicionados 4 mL de solução aquosa do BS e 6 mL de composto hidrofóbico a ser testado (óleo de soja, gordura animal, querosene, decano, vaselina e hexadecano). O tubo foi submetido a agitação máxima em agitador tipo vortex por 2 min, deixando-se em repouso por 24 h. A atividade emulsificante (E24) foi calculada como: (altura da camada emulsionada /altura total de líquido) x 100 (IQBAL, KHALI e MALIK, 1995). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados analisados em software Origin 8.

4.10.2 Biorremediação de petróleo

Foi avaliada pelo método de lavagem de areia contaminada e quantificação da porcentagem de remoção de petróleo de acordo com metodologia descrita por (URUM, PEKDEMIR e COPUR, 2004). Em amostra de 10 g de areia foi adicionada 1 g de petróleo de baixa viscosidade, deixando-se 7 dias em temperatura ambiente. Porções de 5 g da areia contaminada foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL, adicionados de 20 mL da solução de BS (0,1%) e levadas para agitador (shaker) por 6 h a 200 rpm e 30 ºC. Após a retirada da solução aquosa (primeira lavagem), 20 mL de solução BS foram adicionados repetindo-se a lavagem por 6 horas. O líquido da segunda lavagem foi removido e a amostra de areia foi colocada em estufa a 50°C por 12 h. O petróleo residual presente na areia foi extraído por duas lavagens com diclorometano e a massa seca de petróleo aferida após evaporação do solvente e acondicionada em dessecador até peso constante. Como controle, foi realizada a lavagem com água destilada. O diclorometano foi colocado em béquer, previamente tarado em balança analítica, deixando-se secar em estufa à 50^{o}C. Após evaporação do solvente, o béquer foi mantido em dessecador à vácuo até esfriar sendo posteriormente pesado em balança analítica. A porcentagem de remoção de óleo foi determinada pela fórmula: % = (Pi – Pf) / Pi x 100 onde: Pi = peso inicial do béquer com remoção total do óleo por solvente; Pf = peso final do béquer com o óleo resultante das lavagens com BS. Para se calcular o peso inicial (Pi) o conjunto areia mais óleo bruto não foi lavado com BS sendo removido todo o óleo através da lavagem com diclorometano. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados analisados em software Origin 8.

4.10.3 Teste de Estabilidade

Foi realizada uma avaliação da estabilidade do BS sob tratamento térmico em diferentes temperaturas, concentrações hidrogenionica e de sais.

A estabilidade térmica da atividade do BS foi testada mantendo a solução 0,1% de extrato bruto do BS em diferentes temperaturas (-4 a 100^{o}C) por 24 h. Também foi testada a estabilidade da solução de BS às condições de esterilização em autoclave (a solução 0,1% de BS foi mantida por 20 min, 121^{o}C e 1 atm). Após cada teste a

solução foi recondicionada a temperatura ambiente (25 ^{o}C) para medição da tensão superficial.

O efeito da força iônica na atividade do BS foi avaliada medindo a tensão superficial em diferentes concentrações de NaCl entre 0 e 20%.

A estabilidade da atividade do BS em diferentes pHs foi avaliada medindo a tensão superficial em diferentes pHs entre 2 e 12. O ajuste do pH foi realizado utilizando solução 1 N de NaOH e/ou HCl.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados analisados em software Origin 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Seleção dos Micro-organismos produtores de BS

Como parte do projeto Fapesp 2010/15395-2 foram pré-selecionado 59 bactérias de 12 gêneros presentes na coleção de bactérias marinhas do CPQBA/UNICAMP conforme descritas por (MENEZES et al., 2010) (Tabela 5.1).

Tabela 5-1 - Gêneros de isolados marinhos estudados

Gênero	Referências
Acinetobacter	(CHEN et al., 2012)
Arthrobacter	(PRUTHI e CAMEOTRA, 1997)
Bacillus	(SHALIGRAM e SINGHAL, 2010)
Brevibacterium	(KIRAN, et al., 2010a)
Gordonia	(CAREDDA et al., 2009)
Kocuria	(DUBEY et al., 2012)
Microbacterium	(ANISZEWSKI et al., 2010)
Micrococcus	(DAS, DAS e MUKHERJEE, 1998)
Nocardia	(VYAS e DAVE, 2011)
Nocardioides	(VASILEVA-TONKOVA e GESHEVA, 2005)
Paenibacillus	(NAJAFI et al., 2011)
Pantoea	(VASILEVA-TONKOVA e GESHEVA, 2007)

Inúmeros estudos tem demonstrado que é possível identificar novos micro-organismos produtores de BS se utilizando apenas de técnicas relativamente simples. Bodour, Drees e Maier (2003) realizaram o *screening* de 1305 cepas isoladas de solo contaminado com metais e hidrocarbonetos utilizando os métodos adotados no presente estudo, como resultado obtiveram 45 isolados produtores de BS e 1 nova espécie produtora. Satpute et al. (2010c) realizaram uma completa revisão sobre os principais métodos utilizados para seleção de micro-organismos produtores de BS. Estes autores destacam que a combinação de vários métodos é fundamental para uma efetiva seleção de micro-organismos produtores, já que um único método pode não ser capaz de identificar todos os tipos de BS. Desta forma foram utilizados neste trabalho dois métodos complementares para detecção de atividade tensoativa (TS e TCG). Como resultado, foram selecionados para segunda fase de experimentos os isolados bacterianos que apresentaram TS menor ou igual a 40 mN m^{-1} ou resultado positivo para teste do colapso da gota (Tabela 5.2).

As bactérias B101(*Micrococcus* sp.), B204 (*Gordonia* sp.), B476 (*Micrococcus* sp.), B454 (*Pantoea* sp.), B502(*Kocuria* sp.), e B141 (*Kocuria* sp.) apresentaram teste positivo para o colapso da gota, no entanto não foi verificada relevante redução da TS, comportamento esperado, visto que segundo a literatura muitos compostos emulsionantes geram resultados positivos no colapso da gota, entretanto não reduzem a TS (YOUSSEF et al., 2004).

O isolado B204 do gênero *Gordonia* apresentou atividade tensoativa, no entanto não apresentou redução da TS, esse comportamento pode estar relacionado à produção de compostos emulsificantes. Esta possibilidade pode ser confirmada, haja vista que (FRANZETTI et al., 2008) verificaram a produção do emulsificante Bioemulsan por três isolados do gênero *Gordonia.* Similarmente, (DAS, DAS e MUKHERJEE, 1998) constataram atividade emulsificante em cultivo de um isolado *Micrococcus* sp., todavia, não foi verificado significante redução da TS.

Tabela 5-2 – Resultados da seleção preliminar de micro-organismos através de medidas de tensão superficial (MGP) e teste do colapso da gota

Isolado	Meio de crescimento	Tensão Superficial (mN m^{-1})			
		Meio de produção (substrato)			
		Óleo de Soja	Vaselina	Sacarose	Glicerol
B101	M1	**52 (+)***	70	70	70
B123	GPY	**39 (+)**	70	70	70
B135	MA	69	69	69	**56 (+)**
B141	MA	**55 (+)**	62	62	**52 (+)**
B146	MA	72	**49 (+)**	70	70
B155	TSA	70	70	**50 (+)**	**39 (+)**
B189	MA	69	69	69	**40 (+)**
B198	M1	50	**52 (+)**	63	59
B204	M1	**70 (+)**	70	65	70
B454	M1	**56 (+)**	**72 (+)**	**70 (+)**	71
B476	GPY	57	71	**70 (+)**	**70 (+)**
B502	MA	**50 (+)**	50	63	61

*(+) resultado positivo para o tese do colapso da gota.

Na segunda fase de experimentos a produção do BS foi acompanhada em períodos regulares de tempo até 96 h (pré-cinética) utilizando medidas de TS e teste do

colapso da gota (TCG), sendo os resultados apresentados na Tabela 5.3. Os isolados que apresentaram maior redução da TS foram selecionados para terceira fase de experimentos, onde foi realizada a cinética de produção. Deste modo, foram selecionados os isolados: B123 crescendo em óleo de soja, B189 em vaselina e B204 em óleo de soja.

Tabela 5-3 - Resultados da pré-cinética de produção de BS utilizando medidas de tensão superficial e teste do colapso da gota

Isolado	Substrato	Tensão Superficial (mN m^{-1})									
		Tempo									
		24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
B101	O.S.**	70	71	51	42	**34**	**36(+)**	**34(+)**	**38(+)**	**34(+)**	**38(+)***
	Vaselina	71	70	69	71	72	72	71	70	70	71
	Glicerol	70	71	70	71	71	72	70	70	72	71
	Sacarose	67	72	71	69	70		70	70	70	70
B123	O.S.	69	70	50	**38**	**29(+)**	**31(+)**	**30(+)**	**35(+)**	**40(+)**	**40(+)**
	Vaselina	71	66	69	70	72	71	71	70	70	71
	Glicerol	70	70	69	71	71	70	68	69	63	61
	Sacarose	69	70	69	70		70	61	60	61	63
B135	O.S.	70	69	62	71	59	55	55	50	70	70
	Vaselina	69	70	71	71	71	71	71	71	71	71
	Glicerol	68	72	71	71	67	**40(+)**	**42(+)**	70	64	61
	Sacarose	69	69	70	71	71	72	71	71	71	71
B141	O.S.	**32(+)**	**29(+)**	**38(+)**	**51(+)**	69	69	65	68	67	65
	Vaselina	70	57	70	69	69	68	69	70	72	71
	Glicerol	**36(+)**	**31(+)**	**37(+)**	66	68	68	67	68	67	69
	Sacarose	71	72	69	69	68	39	67	69	64	69
B146	O.S.	69	68	57	69	69	68	71	68	70	69
	Vaselina	69	71	57	69	72	65	69	68	68	67
	Glicerol	**34(+)**	**33(+)**	**48(+)**	69	69	68	64	**69(+)**	69	69
	Sacarose	69	70	70	68	69	68	70	67	70	68
B155	O.S.	63	69	70	68	69	68	70	68	70	70
	Vaselina	70	71	69	70	69	69	70	68	68	69
	Glicerol	**41(+)**	**43(+)**	**51(+)**	69	69	69	66	68	68	69
	Sacarose	68	48	70	68	68	68	70	68	69	68
B189	O.S.	68	71	70	60	70	70	71	51	53	71
	Vaselina	68	69	71	71	71	71	**36(+)**	**29(+)**	**29(+)**	**38(+)**
	Glicerol	69	69	71	71	71	70	71	71	70	70
	Sacarose	69	69	71	71	71	70		71	71	71
B198	O.S.	70	62	66	45	48	39	32	43	48	57
	Vaselina	69	70	71	**71(+)**	**50(+)**	**59(+)**	61	61	63	58
	Glicerol	71	70	72	71	71	71	71	70	73	71
	Sacarose	67	70	71	69	70	71	70	71	71	71
B204	O.S.	70	65	60	58	50	57	45	**39(+)**	**39(+)**	**38(+)**
	Vaselina	69	61	56	53	52	50	48	**44(+)**	**40(+)**	**41(+)**
	Glicerol	71	70	70	70	70	72	70	69	**63(+)**	65
	Sacarose	70	66	58	56	55	**40**	41	40	45	49

*(+) resultado positivo para o teste do colapso da gota, **O.S = Óleo de Soja

Tabela 5.3 – Continuação

Isolado	Substrato	Tensão Superficial(mN m^{-1})									
		Tempo									
		24	32	40	48	56	64	72	80	88	96
B454	O.S.	**43(+)**	**40(+)**	**33(+)**	**31(+)**	**39(+)**	**33(+)**	**36(+)**	**33(+)**	**31(+)**	**32(+)**
	Vaselina	70	69	70	63	69	71	71	71	71	70
	Glicerol	71	70	71	71	70	70	70	71	70	70
	Sacarose	69	70	71	68	70	71	69	67	70	67
B476	O.S.	66	71	71	70	71	**41(+)**	**44(+)**	**40(+)**	**40(+)**	**37(+)**
	Vaselina	71	70	72	70	71	69	71	61	61	64
	Glicerol	63	64	69	70	70	70	65	67	66	66
	Sacarose	70	71	69	70	70	71	71	59	58	61
B502	O.S.	67	61	56	47	**45(+)**	**40(+)**	60	56	56	**55(+)**
	Vaselina	69	79	71	59	51	54	**59(+)**	**59(+)**	71	69
	Glicerol	68	70	71	70	71	71	70	71	71	70
	Sacarose	68	72	71	70	71	70	68	65	71	71

*(+) resultado positivo para o teste do colapso da gota, **O.S = Óleo de Soja

O isolado B204 (*Gordonia* sp.) foi selecionado por que foram encontrados indicativos de que bactérias deste gênero tem o seu crescimento celular e a produção de BS substancialmente elevado com a adição de fosfatos inorgânicos ao meio de cultivo (FRANZETTI *et al.*, 2009), evidência esta confirmada nos experimentos de cinética de produção do BS. Similarmente, Boulton e Ratledge (1987); Bodour e Maier (2002); Ron e Rosenberg (2002) afirmaram que a adição de nutrientes inorgânicos pode aumentar a biossíntese de lipídios, polissacarídeo e metabólitos secundários como os BS.

Os resultados da seleção preliminar mostraram que a produção de BS ocorreu preferencialmente quando cultivo foi realizado utilizando substratos hidrofóbicos em detrimento aos substratos hidrofílicos, tal comportamento tem sido observado por inúmeros autores (DEZIEL et al., 1996; FRANZETTI et al., 2008). A produção de BS pode ser uma estratégia para aumentar a biodisponibilidade do substrato não solúvel em água (RON e ROSENBERG, 2001).

5.2 Identificação dos micro-organismos produtores de BS

A identificação dos isolados microbianos selecionados foi realizada pelas pesquisadoras Valéria M. de Oliveira, Milena B. Ferreira e Fabiana Fantinatti-Garboggini utilizando os métodos descritos no item 3.4 e os resultados exibidos na Tabela 5.4.

Tabela 5-4 - Identificação dos isolados microbianos produtores de BS

Isolado	Identificação
B123	*Arthrobacter defluvii*
B189	*Brevibacterium luteolum*
B204	*Gordonia* sp.

O isolado B204 ainda não foi caracterizado com 100% de confiança em nível de espécie, as análises taxonômicas apontam para duas espécies extremamente semelhantes, *Gordonia terrae* e *Gordonia lacunae*, testes bioquímicos posteriores deverão determinar a qual destas pertence o isolado B204. A Tabela 5.5 exibe os principais fenótipos e a Tabela 5.6 a classificação taxonômica das bactérias produtoras de BS selecionadas.

Tabela 5-5 - Principais características morfológicas das espécies bacterianas selecionadas

Espécie	Cor	Gram	Forma da célula	Forma da colônia
A. defluvii	Creme	positivo	Bastonete	irregular
B. luteolum	Amarela	positivo	Bastonete	circular
Gordonia sp.	Laranja	positivo	Bastonete	puntiforme

Tabela 5-6 - Classificação taxonômica das espécies selecionadas

Espécie	*A.defluvii*	*B. luteolum*	*Gordonia sp.*
Gênero	*Arthrobacter*	*Brevibacterium*	*Gordonia*
Família	*Micrococcaceae*	Brevibacteriacea	*Nocardiaceae*
Subordem	*Micrococinae*	*Micrococinae*	*Corynebacterineae*
Ordem	*Actinomycetal*	*Actinomycetal*	*Actinomycetal*
Subclasse	*Actinobacterida*	*Actinobacterida*	*Actinobacterida*
Classe	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*
Filo	*Bacteria*	*Bacteria*	*Bacteria*

Fonte: The Prokaryotes (Dworkin *et al.*, 2006)

5.3 Cinética de produção dos Biossurfatantes

5.3.1 Cinética de produção do Biossurfatantes produzido por *A. defluvii*

A Figura 5.1 apresenta a cinética de produção de BS pelo isolado *Arthrobacter defluvii* utilizando óleo de soja como fonte de carbono, onde a menor TS (31,3 mN m^{-1}) foi alcançada após 72 horas de cultivo. Os valores reduzidos para CMD^{-1} e CMD^{-2} indicam considerável concentração de BS produzido. Também é possível verificar que a produção de BS esta relacionada diretamente ao crescimento celular caracterizando o produto como metabólito primário. Pruthi e Cameotra (1997) exibiram a cinética de produção do BS produzido por *A. protophormiae* frente a n-hexadecano. Segundo os autores, a menor TS superficial ocorreu após 64 h de cultivo e o produto sendo a CMD^{-1} e CMD^{-2} apresentou valores de 35 e 40 mN m^{-1} respectivamente.

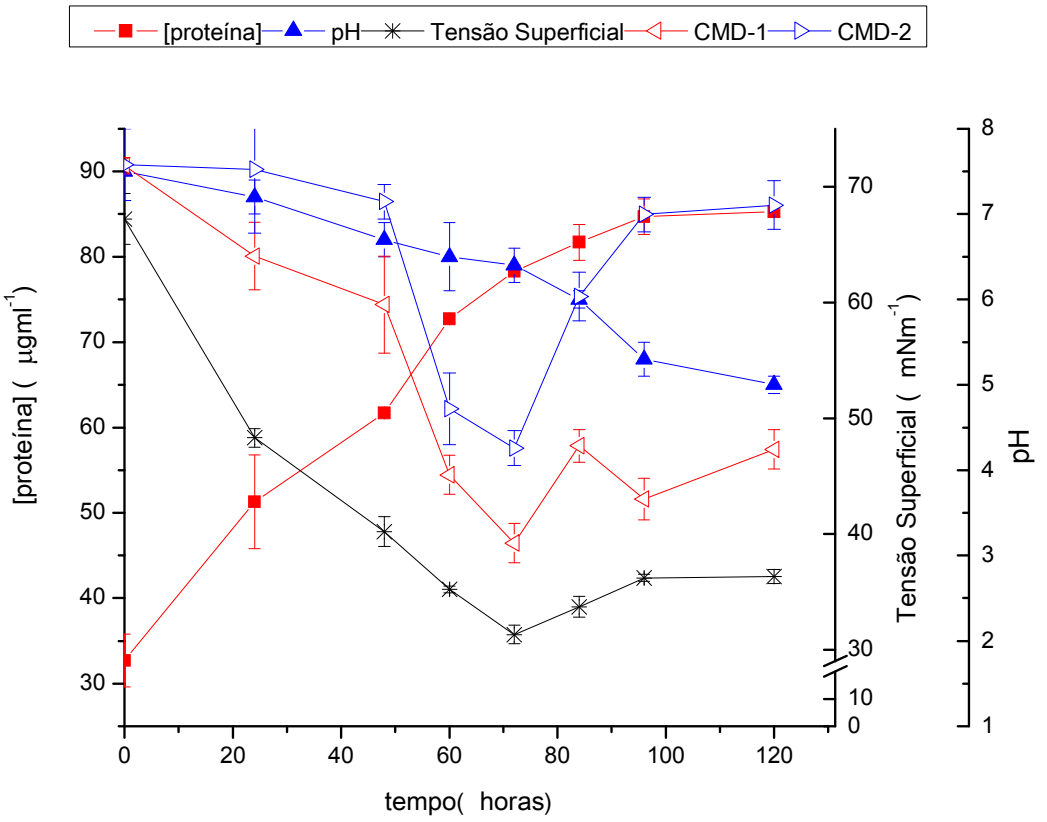

Figura 5-1 - Cinética de produção do BS produzido por *Arthrobacter defluvii* sp. CMD = Diluição Micelar Crítica, CMD^{-1} = 1/10 da concentração inicial, CMD^{-2} = 1/100 da concentração inicial.

5.3.2 Cinética de produção do Biossurfatantes produzido por *B. luteolum*

A Figura 5.2 apresenta a cinética de produção de BS pelo isolado *Brevibacterium luteolum* utilizando vaselina como fonte de carbono, sendo que a menor TS (40 mN m^{-1}) foi alcançada após 60 horas de cultivo. Os valores elevados para CMD^{-1} (30mN m^{-1}) e CMD^{-2} (50mN m^{-1}) indicam que a produção de BS foi baixa. Também foi possível verificar que a produção do BS ocorreu durante a fase de crescimento, portanto o produto é um metabólito primário. (FERHAT et al., 2011) relatou a produção de BS produzido por *Brevibacterium* sp., atingindo a menor TS de 32mN m^{-1} e CMC = 2 g L^{-1}.

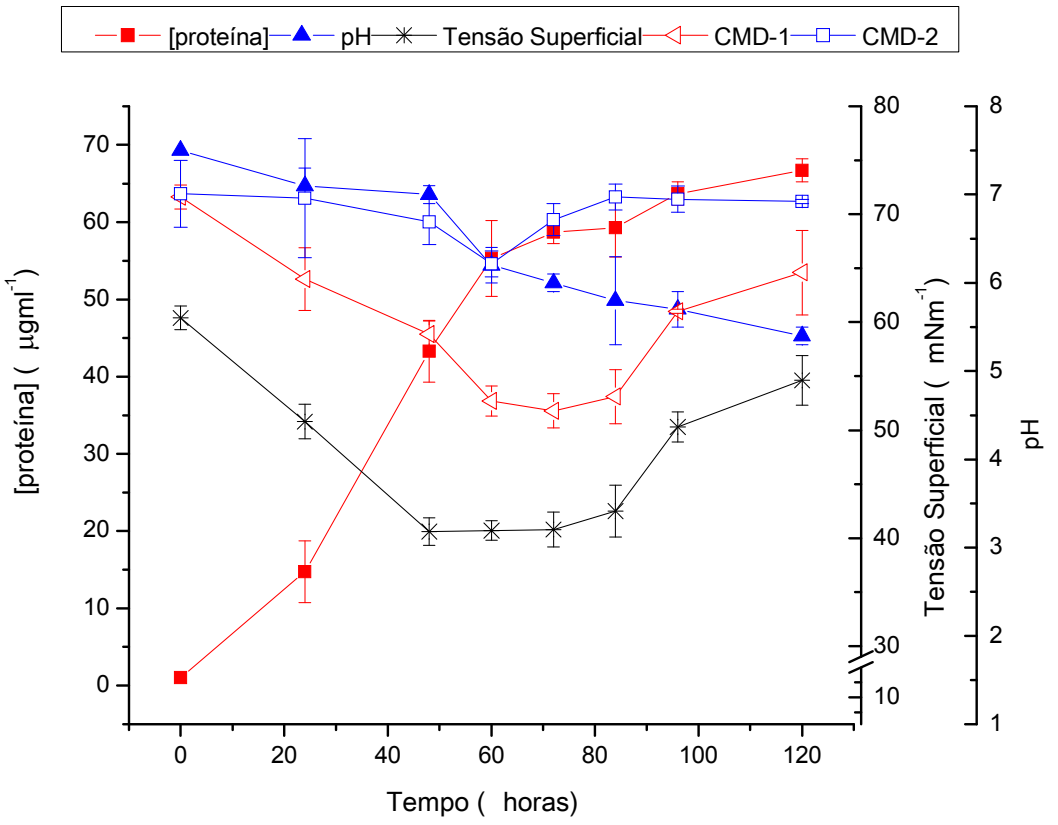

Figura 5-2 - Cinética de produção do BS produzido por *Brevibacterium luteolum*. CMD = Diluição Micelar Crítica, CMD^{-1} = 1/10 da concentração inicial, CMD^{-2} = 1/100 da concentração inicial.

5.3.3 Cinética de produção do Biossurfatantes produzido por *Gordonia* sp.

A Figura 5.3 apresenta a cinética de produção de BS pelo isolado *Gordonia* sp. utilizando óleo de soja como fonte de carbono, sendo que a menor TS (37,2 mN m^{-1}) foi alcançada após 120 horas de cultivo. O baixo valor para CMD^{-1} sugere que a produção de BS foi alta. Também foi possível verificar que a produção do BS ocorreu durante a fase de crescimento, portanto o produto é um metabólito primário. Segundo Heard et al. (2008) a produção de BS por *Gordonia amarae* também ocorre na fase exponencial de crescimento. Saeki et al. (2009) relataram a produção de metabólito secundário com atividade tensoativa por *Gordonia* sp. crescendo em hexadecano, com a produção ocorrendo na fase estacionária e atingindo o máximo em sete dias.

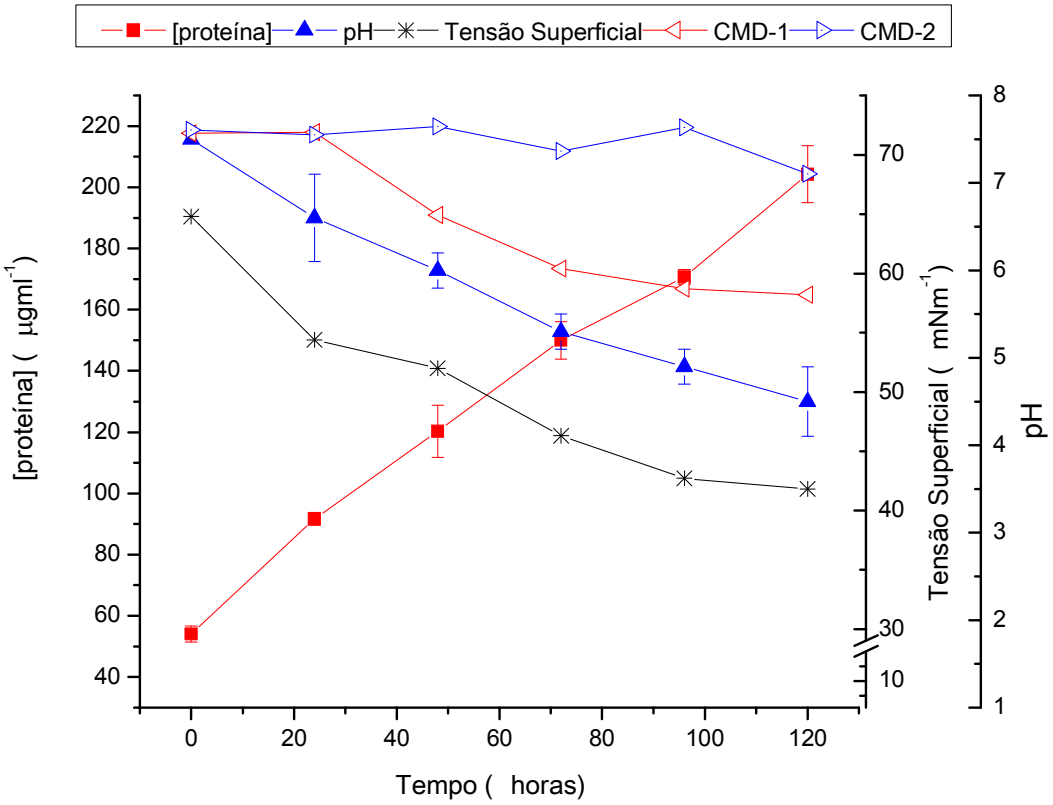

Figura 5-3 - Cinética de produção para o BS produzido por *Gordonia* sp.
CMD = Diluição Micelar Crítica, CMD^{-1} = 1/10 da concentração inicial, CMD^{-2} = 1/100 da concentração inicial.

5.4 Produção dos Biossurfatantes

O tempo ótimo utilizado para produção dos BS foi determinado a partir da cinética do processo (Figura 5.1, 5.2 e 5.3). A Tabela 5.7 exibe os tempos utilizados na produção dos três micro-organismos selecionados.

Tabela 5-7 - Tempo de produção para os micro-organismos selecionados

Micro-organismo	Tempo de produção (horas)
Arthrobacter defluvii	72
Brevibacterium luteolum	60
Gordonia sp.	120

5.4.1 Extração dos Biossurfatantes

Foram testados três métodos de extração de BS descritos no item 4.7. A Tabela 5.8 destaca o método mais eficiente para cada um dos micro-organismos selecionados.

Tabela 5-8 - Métodos de extração mais eficientes para os micro-organismos selecionados

Micro-organismo	Método de extração
Arthrobacter defluvii	Método 3: Precipitação com acetona
Brevibacterium luteolum	Método 1: Precipitação ácida
Gordonia sp.	Método 2: Extração líquido-líquido

A extração do BS produzido por *Gordonia* sp. ainda deverá ser otimizada, visto que a recuperação do BS foi baixa e a indicativos de pode existir dois compostos distintos com atividade tensoativa. Franzetti et al. (2008) descreveram a produção de dois compostos tensoativos por *Gordonia* sp, sendo o primeiro um biemulsificador capaz de formar emulsões estáveis, no entanto, não é capaz de reduzir substancialmente a TS e outro BS Glicolipidico com alto potencial para redução da TS.

5.5 Caracterização físico-química dos Biossurfatantes

5.5.1 Determinação da Tensão Superficial, interfacial e CMC

A Figura 5.4 exibe os resultados da TS para solução 1g L^{-1} e a CMC do extrato bruto de BS, onde todos três isolados apresentaram CMC menor que muitos surfatantes sintéticos (Tabela 2.1). A bactéria *B. luteolum* foi a que apresentou resultados mais promissores, apresentando TS = 27 mN m^{-1} e CMC = 40 mg L^{-1}, valores abaixo do apresentado por exemplo, pelo glicolipídeo produzido por *B. aureum,* CMC = 2000 mg L^{-1} e TS = 31 mN m^{-1} (KIRAN et al., 2010a).

Bactérias do gênero *Arthrobacter* tem sido relatadas como produtoras de diferentes tipos de BS, destacando-se o lipopeptídeo artrofactina produzido *por Arthrobact*er sp. MIS38, o qual é capaz reduzir a TS da água para valores próximos a

24 mN m^{-1}, apresentando CMC de 13,5 mg L^{-1} (MORIKAWA, HIRATA e IMANAKA, 2000).

Os dois principais BS, o Ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* apresenta CMC = 10 – 30 mg L^{-1} e redução TS da água para 25 - 30 mN m^{-1} (Costa et al., 2010), e a surfactina apresenta CMC = 25 – 50 mg L^{-1} e redução da TS da água para 27mN m^{-1} (MORIKAWA, HIRATA e IMANAKA, 2000; BARROS et al., 2007; FRANZETTI et al., 2010b), valores próximos dos apresentados pelos BS obtidos neste trabalho.

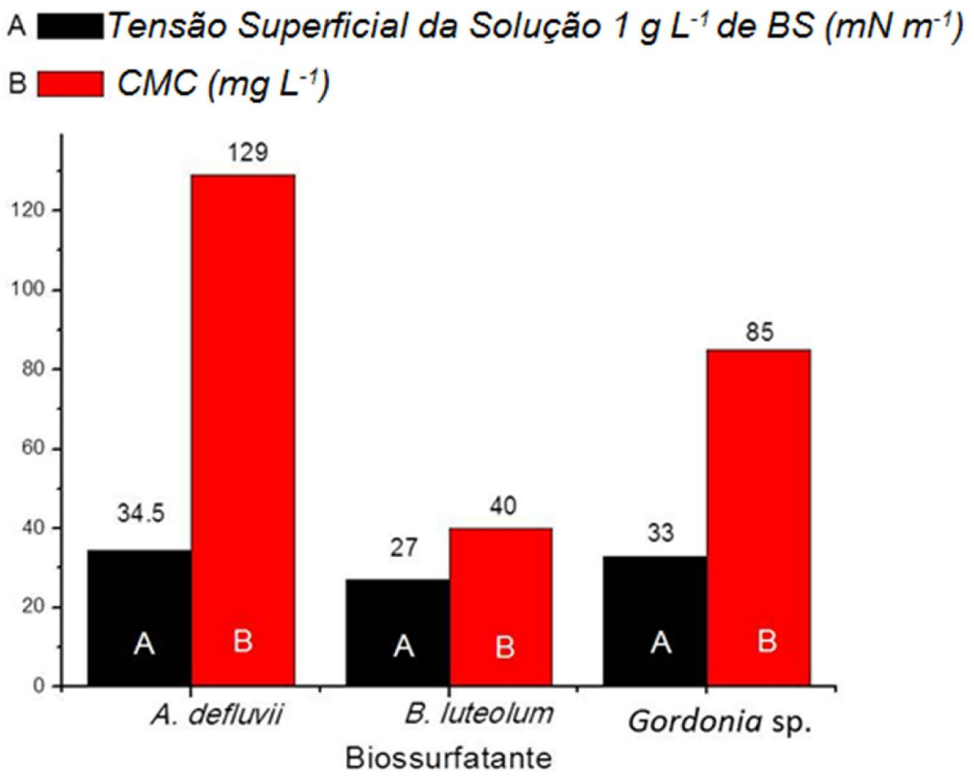

Figura 5-4 - Tensão superficial da solução 1g L^{-1} (A) e CMC (B) dos BS produzidos por *A. defluvii, B. luteolum*, *Gordonia* sp.

A Figura 5.5 exibe a Tensão interfacial (TI) da solução 1 g L^{-1} do extrato de BS frente a hexadecano. Com exceção da TI apresentada pelo sistema com BS produzido por *A. defluvii* (15 mN m^{-1}), os resultados foram altamente promissores, 0,84 mN m^{-1} para o sistema com BS produzido por *B. luteolum* e 1,4 mN m^{-1} para o

sistema com BS produzido por *Gordonia* sp. Como parâmetro de comparação, os dois principais BS, Ramnolipídeo e surfactina, apresentam TI igual a 1,7 e 1,0 mN m^{-1} respectivamente (MORIKAWA, HIRATA e IMANAKA, 2000; BARROS et al., 2007; COSTA et al., 2010)

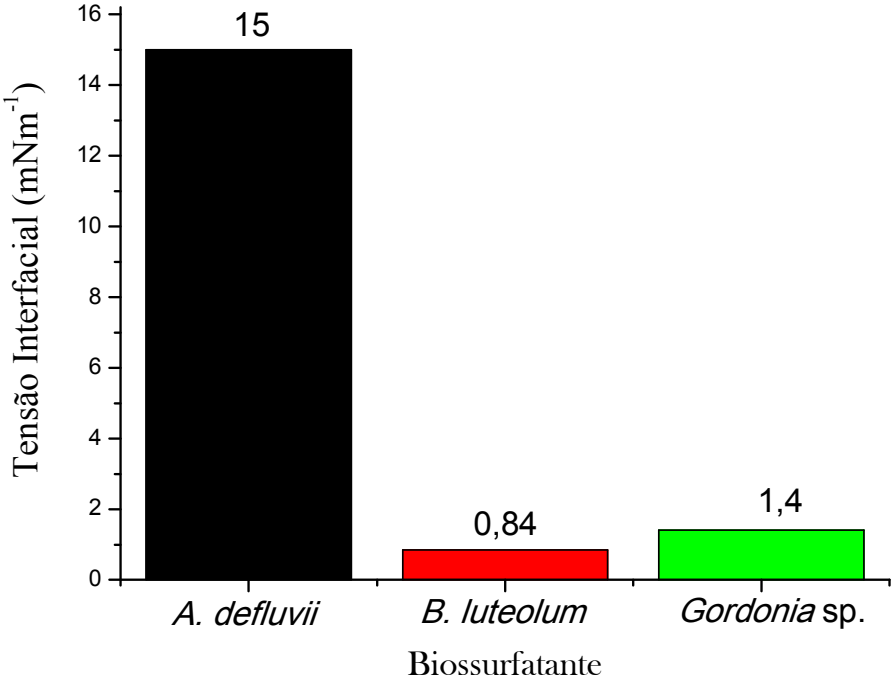

Figura 5-5 - Tensão interfacial entre hexadecano e solução 1 g L^{-1} dos BS produzidos por *A. defluvii, B. luteolum, Gordonia* sp.

5.6 Potencial de aplicação dos BS selecionados

5.6.1 Teste de atividade emulsificante

A atividade emulsificante do BS produzido por *A. defluvii* apresentou %E24 acima de 50% para vaselina, óleo de soja e gordura vegetal (Figura 5.6). A bactéria *A. protophormiae* isolada em solo antártico crescendo em substrato imiscível em água (n-hexadecano (2%v/v) apresentou alta atividade emulsificante (60%) em hexadecano (PRUTHI e CAMEOTRA, 1997). Schulz et al. (1991) relataram a produção de BS glicolipídico por *Arthrobacter* sp. com alta atividade emulsificante para alcanos. DHAIL e JASUJA (2012) relataram a produção de BS por um isolado marinho *Arthrobacter* sp.

MS1 apresentando teste positivo para o colapso da gota e %E24 = 65 frente a n-hexadecano.

O BS produzido por *B. luteolum* apresentou %E24 acima de 50% para todos os substratos testados, alcançando resultados acima 70% para decano, querosene e gordura vegetal (Figura 5.6 e 5.7), resultado similar ao encontrado por Ferhat et al., (2011), onde os autores relataram a produção de BS pela bactéria marinha *Brevibacterium* sp. apresentando valor de %E24 = 95% para óleo de motor.

Já o BS produzido por *Gordonia* sp. apresentou %E24 acima de 50% apenas para óleo de soja e gordura vegetal (Figura 5.6). Ta-Chen, Chang e Young (2008) relataram a produção de um exopolissacarideo com %E24 = 63% frente a óleo diesel. Similarmente o isolado *Gordonia* sp. produz o bioemulsan apresentando %E24 = 83% frente a n-alcanos (FRANZETTI et al., 2008).

No processo de crescimento do isolado *Gordonia* sp. em óleo de soja e vaselina observou-se a formação de espuma e a flotação da células, este comportamento também foi observado por Heard et al. (2008) e Franzetti et al. (2008). Estes autores afirmaram esta ser uma estratégia da célula para facilitar a captação de substratos hidrofóbicos que em solução aquoso ficam na superfície do meio.

Um dos BS mais promissores e estudados, o Ramnolipídeo de *P. aeruginosa*, apresenta %E24 ≈ 100% para óleo de soja, ≈ 80% para benzeno e ≈ 90% para querosene (COSTA et al., 2010), o que mostra a relevância dos valores apresentados pelo isolados selecionados, mesmo, distante das condições otimizadas de crescimento e pureza.

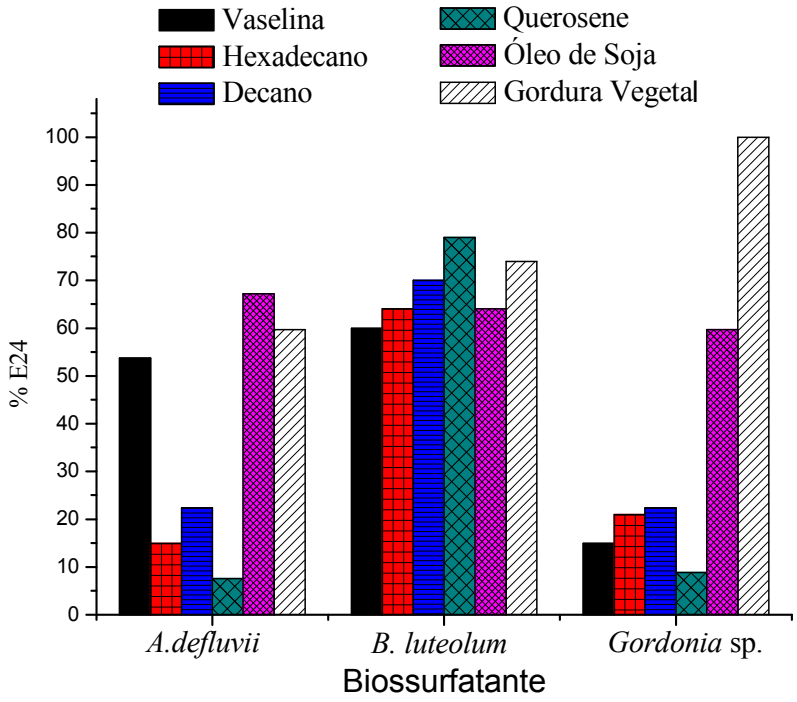

Figura 5-6 - Atividade emulsificante dos BS produzidos por *A. defluvii, B. luteolum, Gordonia* sp. em diferentes compostos orgânicos

Figura 5-7 - Teste de emulsificação para BS produzido por *Brevibacterium luteolum*. (a) óleo de soja; (b) vaselina; (c) decano; (d) querosene; (e) gordura vegetal; (f) hexadecano

As formas de emulsões estáveis do tipo água em óleo (A/O) prevaleceram em todos os testes, ou seja, os BS têm a capacidade de estabilizar gotículas de água em fase hidrofóbica. Emulsões do tipo óleo em água (O/A) foram observadas, no entanto, apresentaram baixa estabilidade.

Estudos tem demostrado que há uma relação da produção de BS e enzimas esterase. Reddy et al. (1989) produziram clones inibindo os genes responsáveis síntese

de esterase, causando também a produção de BS e a biodegradação de hidrocarbonetos. Em alguns casos a produção de BS e esterase parece ser simultânea e cooperativa. Complexos Esterase-BS exibem maior atividade emulsificante e podem ser utilizados com mais eficiência em processos de biorremediação. Genes responsáveis pela síntese de BS e esterase têm sido clonados e expressados em mutantes como estratégia para aumentar a produção. Sekhon, Khanna e Cameotra (2012) realizaram uma completa revisão sobre esta relação entre produção de BS e esterase. A produção de esterase pode ser um fator importante para aumentar produção de BS dos isolados selecionados, algo que pode ser alterado com mínimas mudanças nas condições de cultivo. É interessante que estudos futuros quantifiquem simultaneamente a produção de BS e esterase, assim como identificação dos genes resposáveis pela produção de ambos, visando produção de cepas superprodutoras.

5.6.2 Teste de Biorremediação

A solução de BS 1g L^{-1} produzidos por *A. defluvii*, *B. luteolum*, *Gordonia* sp. removeram em 12 h de lavagem 54%, 83% e 33,5% do petróleo presente na areia respectivamente (Figura 5.8). A lavagem com água, estabelecida como controle, removeu 16,6% do petróleo.

Foram utilizadas concentrações BS acima da CMC calculadas com objetivo de atingir a máxima eficiência do tensoativo.

A concentração de BS utilizada esta acima dos valores de CMC apresentados, visto que soluções com concentrações acima da CMC são mais eficientes para remoção do óleo.

A formação emulsões estáveis pode dificultar acesso do BS às camadas mais internas de petróleo adsorvido, fator que pode ter dificultado a remoção de petróleo (COSTA, 2010). Em um processo de biorremediação a formação de emulsões aumenta a biodisponibilidade do composto hidrofóbico, portanto, esta camada emulsionada que dificulta a emulsificação de camadas internas do petróleo aderido à areia pode ser removida por micro-organismos consumidores. Segundo o autor, o provável mecanismo de remoção de petróleo do solo por surfatantes acontece por mobilização, ou seja, o tensoativo retira e ocupa a superfície onde o contaminante estava aderido. Segundo Urum, Pekdemir e Copur (2004) a remoção ocorre devido à solubilização do hidrocarboneto entre na interface solo-óleo devido a redução da TS.

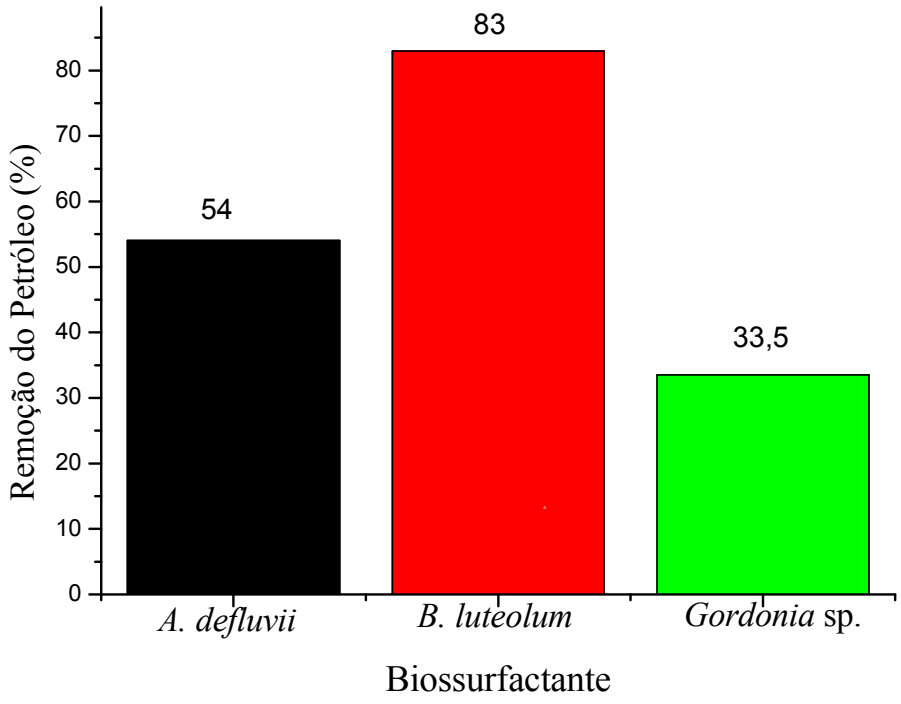

Figura 5-8 - Remoção de petróleo em areia após lavagem com BS produzidos por *A. defluvii, B. luteolum, Gordonia* sp

Quanto maior o tempo de contato entre o petróleo e a areia maior será a adsorção do óleo a superfície, consequentemente o surfatante terá maior dificuldade em formar emulsões. Segundo Urum et al. (2006), com o passar do tempo a eficiência da remoção do óleo no sedimento reduz gradativamente, mesmo aumentando a concentração do BS. Segundo o autor, ocorrem dois fenômenos cumulativos que dificultam a remoção do óleo: a evaporação de hidrocarbonetos voláteis de baixa massa molecular (inferior a C15) e o aumento da densidade e viscosidade. Como consequência ocorre uma maior adsorção do óleo no sedimento, dificultando a interação da solução do BS com o óleo.

Neste trabalho o petróleo foi deixado em contato com a areia por sete dias a fim de mimetizar uma situação real de derrame. Utilizando a mesma metodologia, Costa et al. (2010) mostraram que o ramnolipídeo remove 98% de petróleo em 1 hora de lavagem. Dentre os tensoativos estudados, o BS produzido por *B. luteolum* tem a maior

capacidade de formar emulsões e foi também o que apresentou maior porcentagem de remoção.

5.7 Caracterização estrutural preliminar

5.7.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

De forma geral, a análise por CCD do extrato do BS produzido por *A. defluvii* exibiu a presença de três *spots* como resultado positivo para presença de aminoácidos (revelador ninhidrina) e lipídeos (vapor de iodo), indicando a possibilidade de composto seja um lipopeptídeo (Figura 5.9). Cipinyte et al. (2011) também caracterizaram por CCD um lipopeptídeo BS produzido por *Arthrobacter* sp. utilizando os mesmos reveladores, nele o autor identificou três *spots* com a presença de compostos tensoativos.

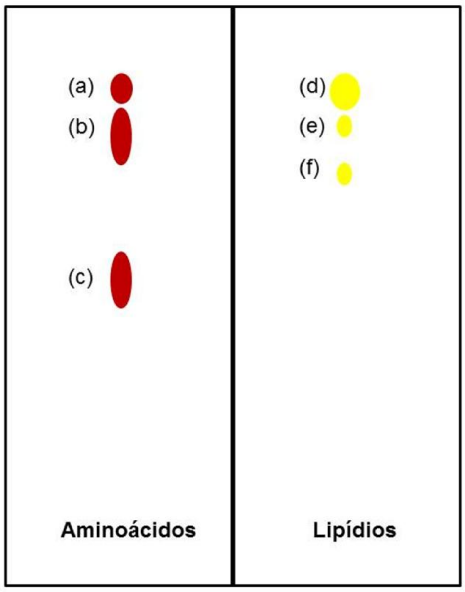

Figura 5-9 - Ilustração da placa de cromatografia em camada delgada do extrato bruto do BS produzido por *Arthrobacter defluvii.* Resultado positivo para os reveladores: ninhidrina (aminoácidos) e vapor de iodo (lipídios). Fator de retenção (a) = 0,98; (b) = 0,88; (c) = 0,7; (d) = 0,98; (e) = 0,89; (f) = 0,80

A análise por CCD do extrato do BS produzido por *B. luteolum* indica a presença de aminoácidos (revelador ninhidrina), onde é possível visualizar um *spot*, além disso, foi possível determinar a presença de lipídeos (vapor de iodo), apresentando três *spots* (Figura 5.10). Kiran et al. (2010b) utilizaram as mesmas técnicas como parte das análises que caracterizaram um lipopeptídeo produzido pela bactéria marinha *Brevibacterium aureum*.

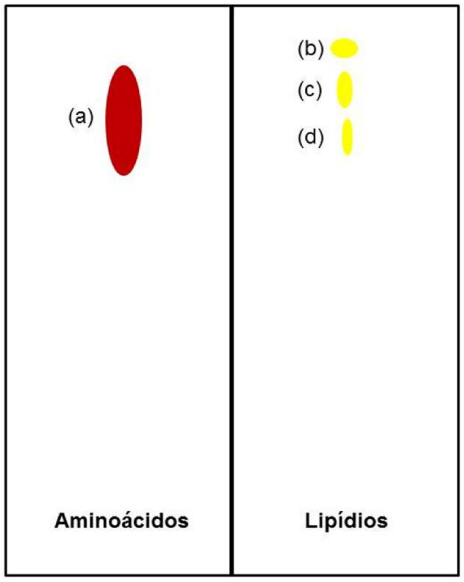

Figura 5-10 - Ilustração da placa de cromatografia em camada delgada do extrato bruto do BS produzido por *Brevibacterium luteolum.* Resultado positivo para os reveladores: ninhidrina (aminoácidos) e vapor de iodo (lipídios). Fator de retenção (a) = 0,90; (b) = 1,00; (c) = 0,94; (d) = 0,86

Através da análise por CCD do extrato do BS produzido por *Gordonia* sp. foi possível determinar a presença de ácucares (α-naftol) e ausência de aminoácidos e lipídeos (Figura 5.11). Ta-Chen, Chang e Young (2008) relataram a produção de Exopolissacarídeos (EPS) com atividade tensoativa por *Gordonia alkanivorans*, segundo os autores a presença de EPS foi capaz de aumentar a biodegradação de óleo diesel proporcionando a flotação celular e consequentemente maior contato das células com o composto hidrofóbico na superfície da uma solução aquosa.

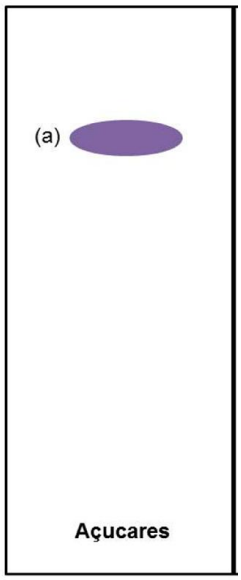

Figura 5-11 - Ilustração da placa de cromatografia em camada delgada do extrato bruto do BS produzido por *Gordonia* sp. Resultado positivo para os reveladores α-naftol (açucares), apresentando fator de retenção = 0,93

As tabelas 5.9 e 5.10 apresenta um resumo das análises em cromatografia em camada delgada para os BS isolados e os padrões utilizados para cada revelador.

Tabela 5-9 - Resumo das análises em CCD para os BS isolados

Revelador	*Gordonia* sp.	*A. defluvii*	*B. luteolum*
α-Naftol (açucares)	(+)	NI	NI
Ninhidrina (aminoácidos)	NI	(+)	(+)
Acido Fosfomolibdico (ésteres)	(+)	NI	NI
Vapor de Iodo (lipídeos)	NI	(+)	(+)

Tabela 5-10 - Resumo das análises em CCD para os padrões utilizados

Revelador	Glicina	Óleo de Soja	Sacarose	Ácido Oleico	Surfactina	Ramnolipídeo
α-Naftol	NI	NI	(+)	NI	NI	(+)
Ninhidrina	(+)	NI	NI	NI	(+)	NI
Acido Fosfomolibdico	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Vapor de Iodo	NI	(+)	NI	(+)	NI	NI

5.7.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (IVTR)

O espectro de infravermelho do extrato do BS produzido por *A. defluvii* é apresentado no Figura 5.12. É possível observar as bandas de deformação assimétrica (3423 cm^{-1}), simétrica (3184 cm^{-1}) e de C=O (1672 cm^{-1}) característicos de uma função amina. A mesma deformação axial de C=O (1672 cm^{-1}) associado a banda em 2923 cm^{-1} pode ser indicativo da presença do grupo funcional ácido carboxílico, dessa forma indicam a presença de peptídeos na amostra. As bandas localizadas entre 2852 e 2954 cm-1 indicam a presença de cadeias carbônicas alifáticas, ou seja, pode ser o indicativo da presença de uma cadeia lipídica na amostra (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005).

A análise estrutural preliminar através de CCD e IVTR confirmou a presença de grupos aminos e lipídicos nos BS produzidos por *A. defluvii*, o que sugere se tratar de lipopeptídeo com propriedade tensoativas. Morikawa et al. (1993) também identificou a produção de BS lipopeptídico chamado Artrofactina produzido por *Arthrobacter* sp. A produção de lipopeptídeos com propriedades tensoativas produzido por *Arthrobacter* sp. também foi relatado por Cipinyte et al. (2011), o qual se mostrou capaz de biodegradar hidrocarbonetos.

.

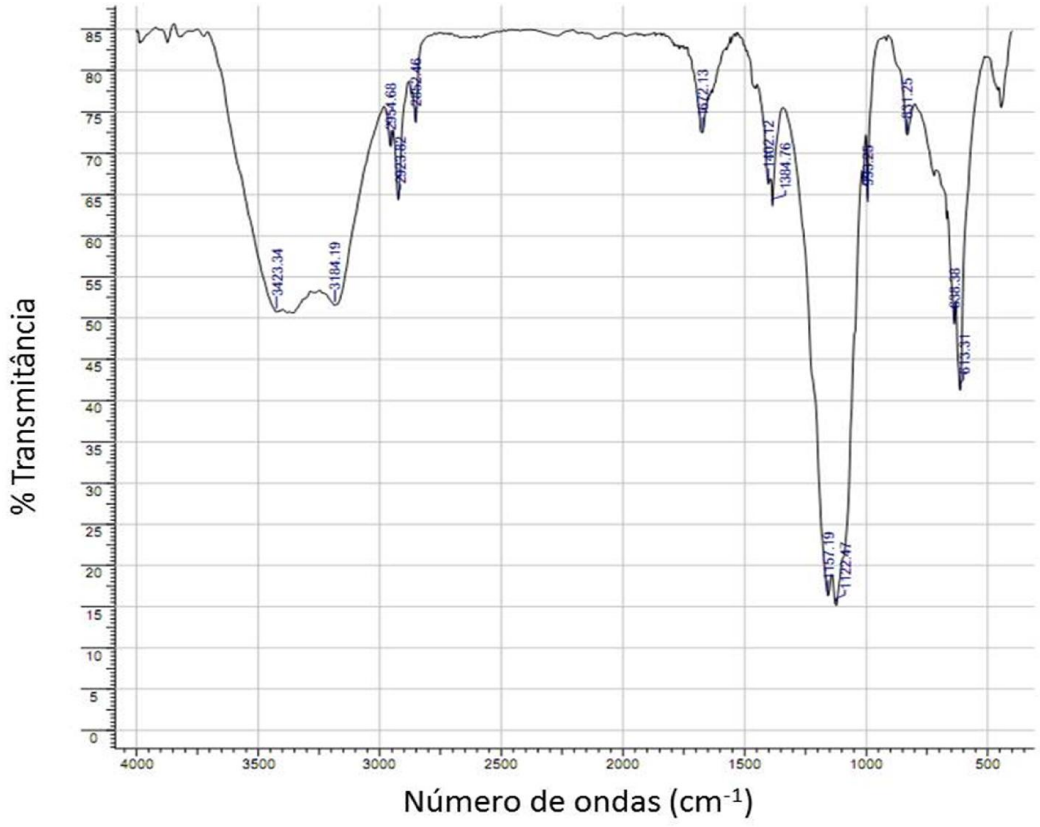

Figura 5-12 - Espectro de infravermelho do Biossurfatante produzido por *Arthrobacter defluvii.*

O espectro de infravermelho do extrato do BS produzido por *B. luteolum* é apresentado na Figura 5.13, onde é possível observar as banda de deformação assimétrica (3409 cm^{-1}), simétrica (3270 cm^{-1}) e de C=O (1656 cm^{-1}) característicos de uma função amina. A mesma deformação axial de C=O (1656 cm^{-1}) associado a banda em 2925 cm^{-1} pode ser indicativo da presença do grupo funcional ácido carboxílico, dessa forma indicam a presença de peptídeos na amostra. As bandas localizadas entre 2854 e 2950 cm-1 indicam a presença de cadeias carbônicas alifáticas, ou seja, pode ser o indicativo da presença de uma cadeia lipídica na amostra (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005). A banda em 1735 cm^{-1} sugere a presença de um anel lactônico, estrutura semelhante à surfactina, BS produzido por *Bacillus* sp. (BECHARD et al., 1998).

Sendo assim, a análise estrutural preliminar através de CCD e IVTR confirmou a presença de grupos aminos (possivelmente cíclico) e lipídicos nos BS produzidos por *B. luteolum*, o que sugere se tratar de lipopeptídeo com propriedade tensoativas, sssim como o lipopeptídeo produzido por *B. aureum* caracterizado e

relatado como agente antimicrobiano contra diversos micro-organimos patógenos como *Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa,* e *Staphylococcus epidermidis* (KIRAN, SABARATHNAM e SELVIN, 2010a)

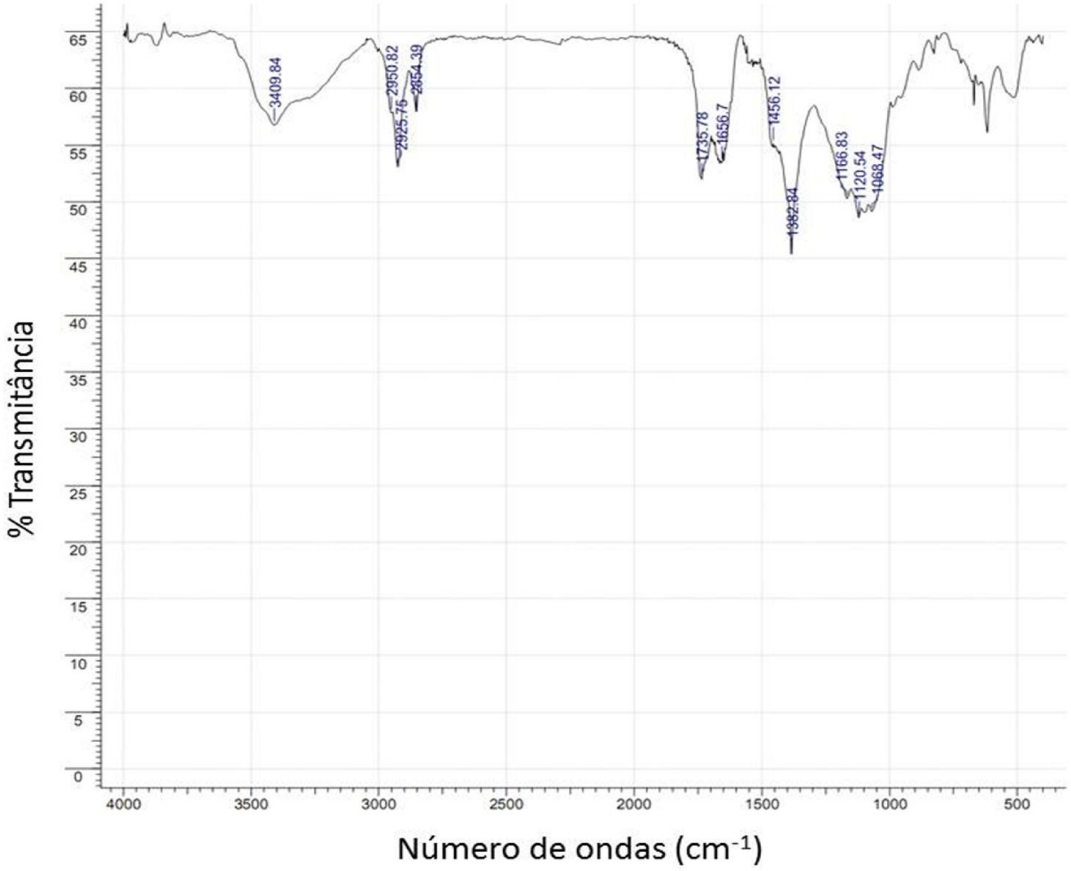

Figura 5-13 - Espectro de infravermelho do Biossurfatante produzido por *Brevibacterium luteolum*

O espectro de infravermelho do extrato do BS produzido por *Gordonia* sp. é apresentado no Figura 5.14, onde é possível observar a banda em 2852 cm^{-1} característico de aldeídos e a banda em 1739 cm^{-1} que sugere a presença de uma lactona saturada. Sendo assim, a análise estrutural preliminar através de CCD e IVTR sugere que o BS produzido por *Gordonia* sp. se trata de um açucar cíclico (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005). Ta-Chen, Chang e Young (2008) relataram a produção de exopolissacarídeos por *Gordonia alkanivorans* que possuem atividade tensoativa (%E24 > 63%) altamente promotora da degradação de hidrocarbonetos. Saeki et al. (2009) também descreveram a produção de um composto polissacarídico de alto peso molecular com alta atividade tensoativa. Isso sugere que o BS produzido por *Gordonia* sp. seja um EPS

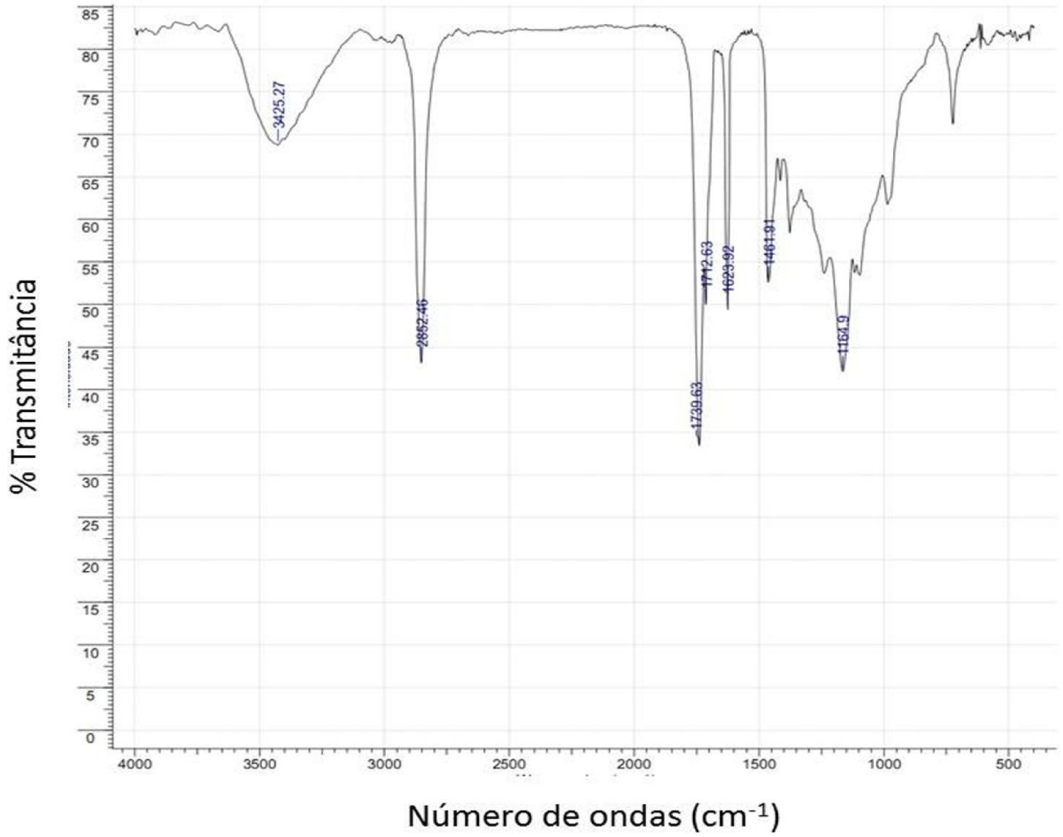

Figura 5-14 - Espectro de infravermelho do Biossurfatante produzido por *Gordonia* sp.

5.7.3 Teste de Estabilidade

A Figura 5.15 apresenta os resultados do teste de estabilidade térmica do BS produzido por *B. luteolum*. A solução de BS 0,1% foi submetida a temperaturas entre -4 e 100^{o}C por 24 h e sequente recondicionamento à temperatura ambiente. Também foi testado a estabilidade da solução de BS às condições de esterilização em autoclave por 20 min, 121^{o}C e 1 atm. A atividade do BS permaneceu estável em temperaturas abaixo de 60^{o}C por 24 h. Elevando a temperaturas acima de 60^{o}C, a tensão superficial aumenta, no entanto, mantem em valores abaixo de 40 mN m^{-1}, indicando que parte do BS foi degradado, mas que uma quantidade considerável permaneceu estável conferindo atividade tensoativa à amostra. Por outro lado, o teste em autoclave por 20 min indicou que BS não é degradado quando submetido a esterilização por autoclave, embora seja submetido a temperatura acima de 100^{o}C, o tempo de tratamento foi consideravelmente

menor. Em 25°C a TS é igual de 27,1 mN m^{-1}e após passar por condições de esterilização em autoclave esse valor oscilou para 30,4 mN m^{-1}. Outro estudo de estabilidade de um BS lipopeptideo produzido por *Brevibacterium* sp. demonstrou que a atividade emulsificante do BS permanece estável em tratamento térmico por 15 min até 100°C (FERHAT et al., 2011). O isolado marinho *Oceanobacillus* sp. produz um BS lipoproteico com também estável até 70°C, acima desta temperatura a atividade emulsificante decai consideravelmente (JADHAV et al., 2013).

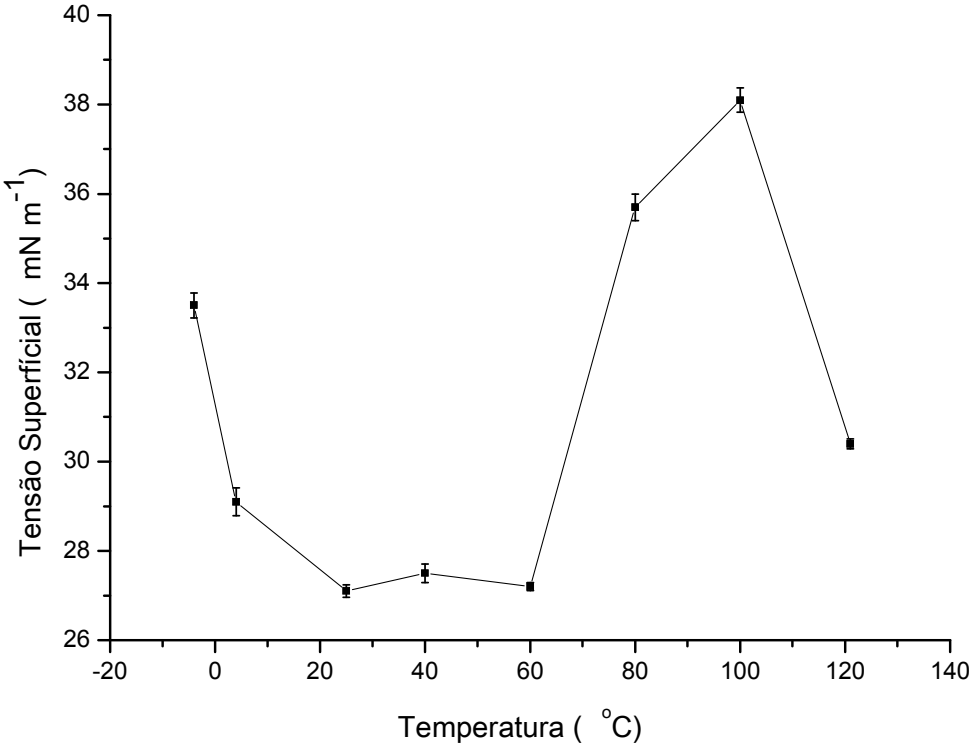

Figura 5-15 - Estabilidade Térmica do BS produzido por *Brevibacterium luteolum*

A Figura 5.16 apresenta os resultados do efeito da concentração salina na atividade do BS em diferentes concentrações de NaCl (0 – 10% m/v) em 0,1% de BS. A atividade tensoativa do BS produzido por *B. luteolum* permeneceu estável na faixa de concentração entre 0 e 16% de NaCl, acima deste valor a TS superficial aumenta e a solução começa a saturar. É importante destacar que o ambiente marinho em que esta biomolécula é produzida possui concentração de sais da ordem de 3,5%, consideravelmente abaixo dos 20% ao qual o BS foi testado (STUMM, 1981). Em

geral, outros autores tem demonstrado que a concentração salina não tem grande efeito sobre a atividade tensoativa de BS lipopeptídicos até valores entre 15 e 20% (NITSCHKE e PASTORE, 2006; GHOJAVAND et al., 2008). Portanto, este micro-organismo tem potencial para utilizado em processos de biorremediação através da bioaumentação em ambiente marinho, já que além de produzir BS em altas concentrações salinas, o BS é estável em concentrações salinas superiores a da água do mar.

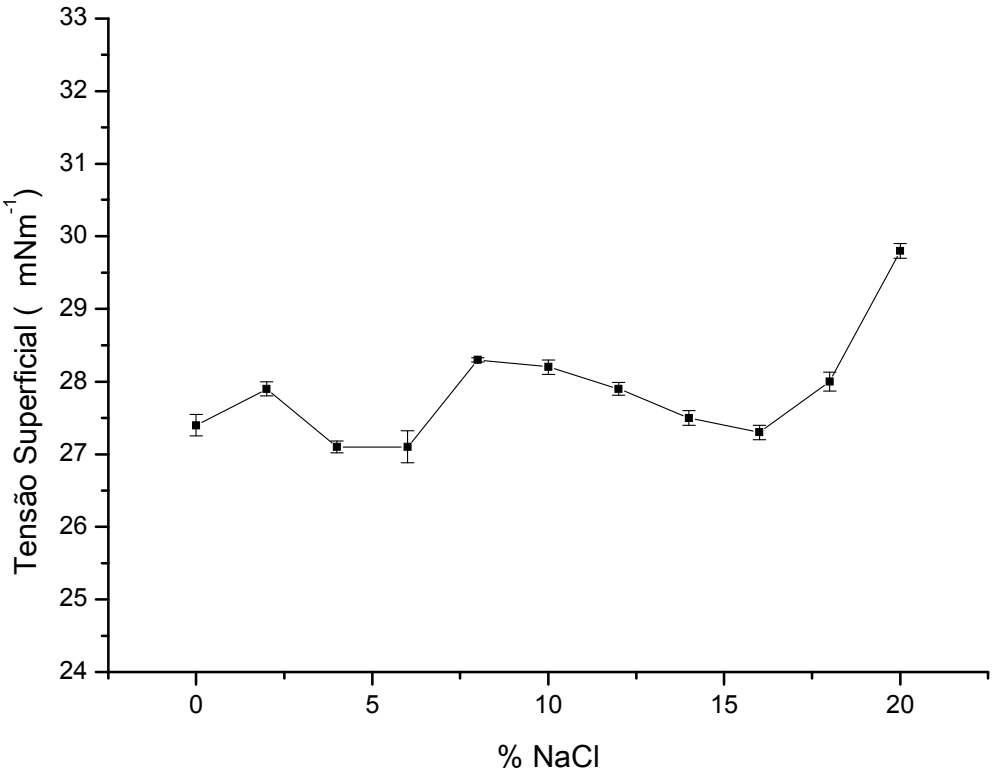

Figura 5-16 - Estabilidade do BS produzido por *Brevibacterium luteolum* em diferentes concentrações salinas.

O gráfico Figura 5.17 apresenta os resultados do efeito do pH na atividade tensoativa do BS. A solução 0,1% foi ajustada a valores de pH entre 2 e 12 utilizando solução de NaOH e HCl 1N, a tensão superficial foi medida a cada unidade de pH acrescida. Os resultados indicam que na faixa de pH entre 6 e 8 o BS apresenta a maior atividade tensoativa. Em valores de pH abaixo de 5 e acima de 8 a atividade do BS decresce substancialmente, assim como outras moléculas biológicas, os BS tendem a ser

ativos em faixas restritas de pH (ARIMA, KAKINUMA e TAMURA, 1968). A redução do pH tem sido utilizada como método de separação de BS lipopeptídicos, visto que em valores abaixo de pH 2 todos os aminoácidos estão carregados positivamente, reduzindo a efetividade da parte hidrofílica, causando agregação destas biomoléculas (NITSCHKE e PASTORE, 2006; SATPUTE et al., 2010c)

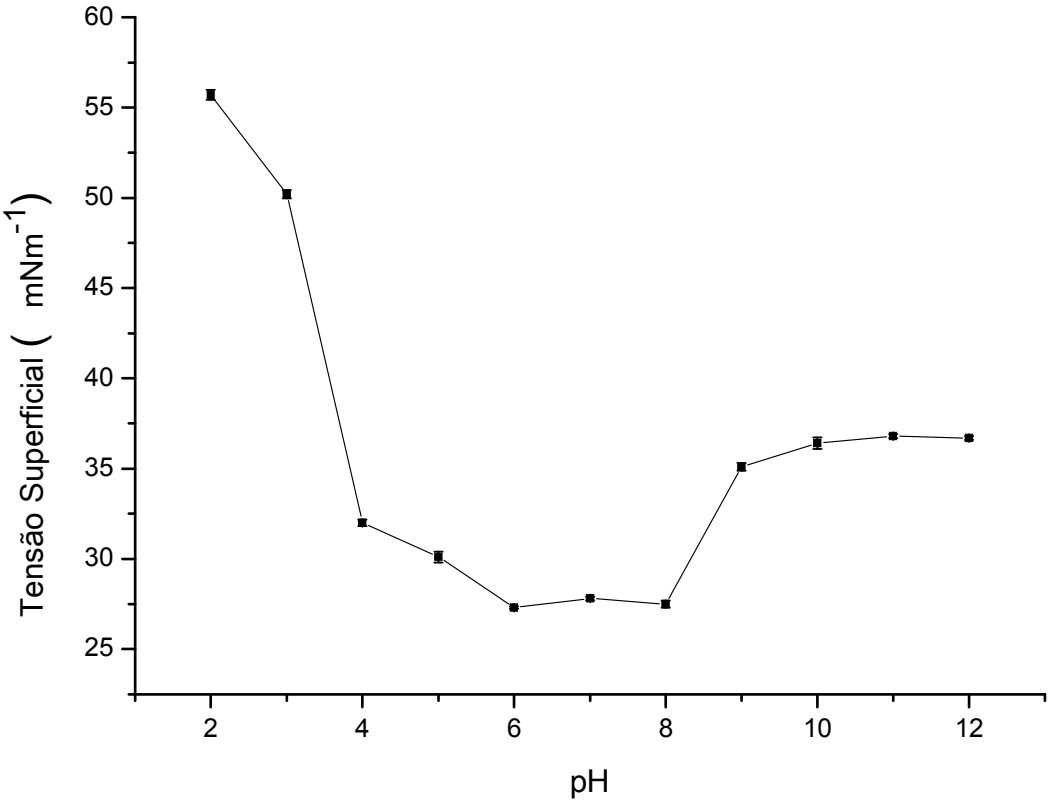

Figura 5-17 - Estabilidade do BS produzido por *Brevibacterium luteolum* em diferentes concentrações hidrogenionicas (pH).

6 CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos pode-se afirmar que:

I. A bactéria marinha *Arthrobacter defluvii* utiliza o óleo de soja como fonte de carbono para produção de um lipopeptídeo com atividade tensoativa. Além disso, a alta atividade emulsificante em composto alifáticos de cadeia longa (vaselina) e a eficiência na lavagem de solo contaminado com petróleo exibe grande potencial do BS para aplicações ambientais.

II. A bactéria marinha *Brevibacterium luteolum* utiliza a vaselina como fonte de carbono para produção de um lipopeptídeo com atividade tensoativa. Dentre os três BS caracterizados foi a que apresentou maior atividade tensoativa e emulsificação de uma ampla gama de compostos hidrofóbicos e estabilidade em ampla faixa de pH, temperatura e concentração salina, indicando grande potencial para aplicações ambientais como biorremediação, assim como em processos industriais de lavagem e melhoria na extração de petróleo (MEOR).

III. O isolado marinho *Gordonia* sp. utiliza o óleo de soja como fonte de carbono para produção de um composto polissacarídico com atividade tensoativa. O composto se mostrou capaz de emulsificar compostos hidrofóbicos de origem animal e vegetal (gordura vegetal e óleo de soja) e dentre os três compostos a menor atividade tensoativa.

IV. Os três micro-organismos marinhos selecionados foram capazes de produzir compostos com relevante atividade tensoativa utilizando substratos de baixo custo.

7 PERSPECTIVAS

Os micro-organismos apresentam grande potencial para produção de BS, no entanto, estudos futuros deverão ser realizados buscando otimizar o meio de cultivo, o processo de separação e purificação, assim como possibilidade de manipulação genética para produzir cepas superprodutoras.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LEPINE, F.; DEZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 86, n. 5, p. 1323-1336, 2010.

ACHTMAN, M.; WAGNER, M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. **Nature Reviews Microbiology,** v. 6, n. 6, p. 431-440, 2008.

ANISZEWSKI, E.; PEIXOTO, R. S.; MOTA, F. F.; LEITE, S. G. F.; ROSADO, A. S. Bioemulsifier production by microbacterium sp. Strains isolated from mangrove and their application to remove cadmiun and zinc from hazardous industrial residue. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 41, n. 1, p. 235-245, 2010.

ARENA, A. Exopolysaccharides from marine thermophilic bacillus induce a thl cytokine profile in human PBMC. **Clinical Microbiology and Infection,** v. 10, n. supplement 3, p. 366-485, 2004.

ARENA, A; MAUGERI, T. L.; PAVONE, B.; IANNELLO, D.; GUGLIANDOLO, C.; BISIGNANO, G. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant Bacillus licheniformis. **International Immunopharmacology,** v. 6, n. 1, p. 8-13, 2006.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin a crystalline peptidelipid surfactant produced by bacillus subtilis - isolation characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 31, n. 3, p. 488, 1968.

ATTENSION. **Surface tension. Web site**. 2013 Disponível em: < http://www.attension.com/surface-tension >. Acesso em: 13 fev. 2013.

AUSTIN, B.; GARGES, S.; CONRAD, B.; HARDING, E. E.; COLWELL, R. R.; SIMIDU, U. TAGA, N. Comparative-study of the aerobic, heterotrophic bacterial-flora of chesapeake bay and tokyo bay. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 37, n. 4, p. 704-714, 1979.

BAHARUM, S. N.; BENG, E. K.; MOKHTAR, M. A. A. Marine microorganisms: potential application and challenges. **Journal of Biological Sciences,** v. 10, n. 6, p. 555-564, 2010.

BANAT, I. M.; FRANZETI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRANCCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BARKAY, T.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 65, n. 6, p. 2697-2702, 1999.

BARROS, F. F. C.; DE QUADROS, C. P; MARSTICA, M. R.; PATORE, G. M. Surfactin: Chemical, technological and functional properties for food applications. **Quimica Nova,** v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BECHARD, J.; EASTWELL, K. C.; SHOLBERG, P. L.; MAZZA, G.; SKURA, B. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of bacillus subtilis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 46, n. 12, p. 5355-5361, 1998.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 69, n. 6, p. 3280-3287, 2003.

BODOUR, A. A.; MAIER, R. M. Biossurfactants: types, screening methods, and applications. In: **ENCYCLOPEDIA of environmental microbiology**. New York: John Wiley and Sons Inc, 2002. p.750-770.

BOSCHEN, S.; LENOIR, D.; SCHERINGER, M. Sustainable chemistry: starting points and prospects. **Naturwissenschaften,** v. 90, n. 3, p. 93-102, 2003.

BOULTON, C. A.; RATLEDGE, C. Biosynthesis of lipids precursors to surfactant production. In: KOZARIC, N. (Ed.). **Biosurfactants surfactant science series**. New York: Marcel Dekker, 1987, v. 25, p.48-83.

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

CAMILIOS-NETO, D.; BUGAY, C.; DE SANTANA-FILHO, A. P.; JOSLIN, T.; DE SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 89, n. 5, p. 1395-1403, 2011.

CAO, G. Q.; ZHANG, X. H.; ZHONG, L.; LU, Z. X. A modified electro-transformation method for bacillus subtilis and its application in the production of antimicrobial lipopeptides. **Biotechnology Letters,** v. 33, n. 5, p. 1047-1051, 2011.

CAREDDA, P.; FRANZETTI, A.; PAPACCHINI, M.; LA COLLA, P.; RUGGERI, C.; TAMBURINI, E.; BESTETTI, G. Applications of surface active compounds by gordonia sp. in bioremediation and washing of hydrocarbon-contaminated soils. **Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 671-675, 2009.

CHANDRA, S.; SHARMA, R.; SINGH, K.; SHARMA, A. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. **Annals of Microbiology,** v. 63, n. 2, p. 417-431, 2013.

CHEN, G. Q. New challenges and opportunities for industrial biotechnology. **Microbial Cell Factories,** v. 11, p. 111, 2012.

CHEN, J.; HUANG, P. T.; ZHANG, K. Y.; DING, F. R. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by Acinetobacter sp from petroleum-contaminated soil. **Journal of Applied Microbiology,** v. 112, n. 4, p. 660-671, 2012.

CHOI, J. W.; CHOI, H. G.; LEE, W. H. Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by acinetobacter calcoaceticus RAG-1. **Journal of Biotechnology,** v. 45, n. 3, p. 217-225, 1996.

CIPINYTE, V.; GRIGISKIS, S.; SAPOKAITE, D.; BASKYS, E. Production of biosurfactants by Arthrobacte*r* sp. N3, a hydrocarbon degrading bacterium. In: INTERNACIONAL SCIENTIFIC AND PRACTICAL CONFERENCE, 8., 2011, Rezekne. **Anais…** Rezekne: Rezeknes Augstskola, 2011. p.68 - 75.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from candida-lipolytica. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 50, n. 4, p. 846-850, 1985.

COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por pseudomonas aeruginosa*:* Ramnolipídios e Polihidroxialcanoatos (PHAs).** 2010. 131f. (mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LEPINE, F.; DEZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry,** v. 45, n. 9, 2010.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Fats and oils wastes as substrates for biosurfactant production. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos,** v. 28, n. 1, p. 33-38, 2008.

DALTIN, D. **Tensoativos:** química, propriedades e aplicações. São Paulo: Edgard Blücher, 2011. 330 p.

DANIEL, H. J.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using candida bombicola ATCC 22214 and Cryptococcus curvatus ATCC 20509. **Biotechnology Letters,** v. 20, n. 12, p. 1153-1156, 1998.

DAS, M.; DAS, S. K.; MUKHERJEE, R. K. Surface active properties of the culture filtrates of a Micrococcus species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology,** v. 63, n. 3, p. 231-235, 1998.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Microbial surfactants of marine origin: potentials and prospects. **Biosurfactants,** v. 672, p. 88-101, 2010.

DE FARIA, A. F.; ; STEFANI, D.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; EBERLIN, M. N.; GROSSMAN, M. J.; ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by Bacillus subtilis LSFM-05 grown on raw glycerol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** v. 38, n. 7, p. 863-871, 2011.

DE SOUSA, T.; BHOSLE, S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by pseudomonas nitroreducens TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. **Bioresource Technology,** v. 123, p. 256-262, 2012.

DESAI, A. J.; PATEL, R. M.; DESAI, J. D. Advances in the production of biosurfactants and their commercial applications. **Journal of Scientific & Industrial Research,** v. 53, n. 8, p. 619-629, 1994.

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

DESHPANDE, S.; SHIAU, B. J.; WADE, D.; SABATINI, D. A.; HARWELL, J. H. Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. **Water Research,** v. 33, n. 2, p. 351-360, 1999.

DEZIEL, E.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LEPINE, F.; BISAILLON, J. G. Biosurfactant production by a soil Pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 62, n. 6, p. 1908-1912, 1996.

DHAIL, S.; JASUJA, N. D. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria. **African Journal of Environmental Science and Technology,** v. 6, n. 6, p. 263-266, 2012.

DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHRAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by pseudomonas aeruginosa strain-PP2 and kocuria turfanesis strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology,** v. 126, p. 368-374, 2012.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.; STACKEBRANDT, E. **The prokaryotes -** a handbook on the biology of bacteria. Singapura: Springer, 2006. v. 1-7.

EDSER, C. Greener surfactants. **Focus on Surfactants,** v. 1, n. 1, p. 3, 2012a.

EDSER, C. Natural surfactant raw materials on a slippery slope? . **Focus on Surfactants,** v. 1, n. 6, p. 2, 2012b.

EDSER, C. Surfactants review – a good deal to celebrate. **Focus on Surfactants,** v. 1, n. 6, p. 1-2, 2012c.

EDSER, C. Brazilian surfactants market to reach $1.90 bn in 2018. **Focus on Surfactants,** v. 1, n. 1, p. 3, 2013.

FELSE, P. A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K. J.; GROSS, R. A. Sophorolipid biosynthesis by Candida bombicola from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 40, n. 2, p. 316-323, 2007.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUDA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N.; SAYADI, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by ochrobactrum sp 1C and brevibacterium sp 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 65, n. 8, p. 1182-1188, 2011.

FOLEY, P.; POUR, A. K.; BEACH, E. S.; ZIMMERMAN, J. B. Derivation and synthesis of renewable surfactants. **Chemical Society Reviews,** v. 41, n. 4, p. 1499-1518, 2012.

FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; TAMBURINI, E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in Gordonia strains. **Fems Microbiology Ecology,** v. 63, n. 2, p. 238-248, 2008.

FRANZETTI, A.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; PINTUS, M.; TAMBURINI, E.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Cultural factors affecting biosurfactant production by Gordonia sp BS29. **International Biodeterioration & Biodegradation,** v. 63, n. 7, p. 943-947, 2009.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; BANATT, I. M. (Bio)surfactant and bioremediation, **Successes and Failures Trends in Bioremediation and Phytoremediation**, p. 145-156, 2010a.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; SMYTH, T. J. P.; BANAT, I. M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology,** v. 112, n. 6, p. 617-627, 2010b.

FREITAS DE OLIVEIRA, D. W.; LIMA FRANCA, I. W.; NOGUEIRA FELIX, A. K.; LIMA MARTINS, J. J.; APARECIDA GIRO, M. E.; MELO, V. M. M.; BARROS GONCALVES, L. R. Kinetic study of biosurfactant production by Bacillus subtilis LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 101, p. 34-43, 2013.

GANDHIMATHI, R.; KIRAN, G. S.; HEMA, T. A.; SELVIN, J.; RAVIJI, T. R.; SHANMUGHAPRIYA, S. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes Nocardiopsis alba MSA10. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** v. 32, n. 6, p. 825-835, 2009.

GARTI, N. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 152, n. 1, p. 125-146, 1999.

GEETHA, I.; PAILY, K. P.; MANONMANI, A. M. Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by bacillus subtilis subsp subtilis. **Pest Management Science,** v. 68, n. 11, p. 1447-1450, 2012.

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel pseudomonas aeruginosa. **Journal of Applied Microbiology,** v. 114, n. 2, p. 373-383, 2013.

GHRIBI, D.; ELLEUCH, M.; ABDELKEFI, L.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Evaluation of larvicidal potency of Bacillus subtilis SPB1 biosurfactant against Ephestia kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and influence of abiotic factors on its insecticidal activity. **Journal of Stored Products Research,** v. 48, p. 68-72, 2012.

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

GOMAA, E. Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by Bacillus licheniformis strain M104 grown on whey. **African Journal of Microbiology Research,** v. 6, n. 20, p. 4396-4403, 2012.

GORKOVENKO, A.; ZHANG, J.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. L. Control of unsaturated fatty acid substituents in emulsans. **Carbohydrate Polymers,** v. 39, n. 1, p. 79-84, 1999.

GUERRA, L. H.; THANEI, U.; KATTERER, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; PUHAR, E. Production and properties of a bacterial biosurfactant. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society,** v. 185, n. 3, p. 814, 1983.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; HEIDELBERG, T. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by Pseudomonas putida Bet001 isolated from palm oil mill effluent. **Plos One,** v. 7, n. 9, p. 1-8, 2012.

GUTIERREZ, T.; SHIMMIELD, T.; HAIDON, C.; BLACK, K.; GREEN, D. H. Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by Pseudoalteromonas sp strain TG12. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 74, n. 15, p. 4867-4876, 2008.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology,** v. 88, n. 3, p. 379-387, 2000.

HANSEN, F. K.; RODSRUD, G. Surface-tension by pendant drop .1. A fast standard instrument using computer image-analysis. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 141, n. 1, p. 1-9, 1991

HARTREE, E. F. Determinação of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry,** v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HEARD, J.; HARVEY, E.; JOHNSON, B. B.; WELLS, J. D.; ANGOVE, M. J. The effect of filamentous bacteria on foam production and stability. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 63, n. 1, p. 21-26, 2008.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. **Biophysical Journal,** v. 81, n. 3, p. 1547-1554, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HEYD, M.; KOHNERT, A.; TAN, T. H.; NUSSER, M.; KIRSCHHOEFER, F.; BRENNER-WEISS, G.; FRANZREB, M.; BERENSMEIER, S. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 391, n. 5, p. 1579-1590, 2008.

HUH, C.; MASON, S. G. Rigorous theory of ring tensiometry. **Colloid and Polymer Science,** v. 253, n. 7, p. 566-580, 1975.

IBACACHE-QUIROGA, C.; OJEDA, J.; ESPINOZA-VERGARA, G.; OLIVERO, P.; CUELLAR, M.; DINAMARCA, M. A. The hydrocarbon-degrading marine bacterium Cobetia sp strain MM1IDA2H-1 produces a biosurfactant that interferes with quorum sensing of fish pathogens by signal hijacking. **Microbial Biotechnology,** v. 6, n. 4, p. 394-405, 2013.

INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY (IOCB)- **Equipment**. 2013 Disponível em: < http://www.uochb.cz/web/structure/1158.html >. Acesso em: 14 fev. 2013.

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

ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M.; NAKAHARA, H.; SANO, Y.; ISHIGURO, R.; MATSUMOTO, M. Significance of beta-sheet formation for micellization and surface-adsorption of surfactin. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 4, n. 6, p. 341-348, 1995.

ISLAS, D. J.; MORENO, S. A. M.; RODRIGUEZ, J. N. G. Biosurfactant properties, applications and production a review. **Revista Internacional De Contaminacion Ambiental,** v. 26, n. 1, p. 65-84, 2010.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. 3.ed. New York: Academic Press, 2011. 673p.

JADHAV, V. V.; YADAV, A.; SHOUCHE, Y. S.; APHALE, S.; MOGHE, A.; PILLAI, S.; ARORA, A.; BHADEKAR, R. K. Studies on biosurfactant from oceanobacillus sp BRI 10 isolated from Antarctic sea water. **Desalination,** v. 318, p. 64-71, 2013.

JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; REZANKA, T.; KRASOWSKA, A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by pseudomonas fluorescens BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. **Bioresource Technology,** v. 101, n. 15, p. 6118-6123, 2010.

JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M.; CLARK, J. B.; FEERO, J. M.; REVUS, D. E.; MENZIE, D. E. A halotolerant, biosurfactant-producing bacillus species potentially useful for enhanced oil-recovery. **Developments in Industrial Microbiology,** v. 24, p. 485-492, 1983.

KAAR, W.; HARTMANN, B. M.; FAN, Y.; ZENG, B.; LUA, L. H. L.; DEXTER, A. F.; FALCONER, R. J.; MIDDELBERG, A. P. J. Microbial bio-production of a recombinant stimuli-responsive biosurfactant. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 102, n. 1, p. 176-187, 2009.

KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. Uptake of hydrocarbon by pseudomonas fluorescens (P1) and pseudomonas putida (K1) strains in the presence of surfactants: a cell surface modification. **Water Air and Soil Pollution,** v. 214, n. 1-4, p. 451-459, 2011.

KAPLAN, N.; ROSENBERG, E. Surface-active properties of *Acinetobacter* exopolysaccharides. In: INOUYE, M. (Ed.). **Bacterial outer membranes as model systems**. New York: John Wiley, 1986. p. 311-411.

KASEMODEL, M.; PORTO, A. L. M.; NITSCHKE, M. Biodegradação de DDD utilizando Pseudomonas aeruginosa L2-1. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 35., 2012, Águas de Lindóia. **Livros de Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2012. ref. EQ-101.

KASEMODEL, M.; VILELA, W. F. D.; PORTO, A. L. M.; NITSCHKE, M. Influência da concentração de glicose e da fonte de nitrogênio na biodegradação de dieldrin por P. aeruginosa L2-1. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 2012, Santos. **Livro de Resumos…** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2012. ref. 175-1.

KHANNA, S.; GOYAL, A.; MOHOLKAR, V. S. Microbial conversion of glycerol: present status and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology,** v. 32, n. 3, p. 235-262, 2012.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine Nocardiopsis sp B4. **Desalination,** v. 285, p. 198-204, 2012a.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.-Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine streptomyces species B3. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 367, p. 311-318, 2012b.

KIRAN, G. S.; SABARATHNAM, B.; SELVIN, J. Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine brevibacterium casei. **Fems Immunology and Medical Microbiology,** v. 59, n. 3, p. 432-438, 2010a.

KIRAN, G. S.; THAJUDDIN, N.; HEMA, T. A.; IDHAYADHULLA, A.; KUMAR, R. S.; SELVIN, J. Optimization and characterization of rhamnolipid biosurfactant from sponge associated marine fungi aspergillus sp MSF1. **Desalination and Water Treatment,** v. 24, n. 1-3, p. 257-265, 2010b.

KIRAN, G. S.; THOMAS, T. A.; SELVIN, J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine Nocardiopsis lucentensis MSA04 in solid-state cultivation. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 78, n. 1, p. 8-16, 2010b.

KIRAN, G. S.; THOMAS, T. A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A. P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine brevibacterium aureum MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology,** v. 101, n. 7, p. 2389-2396, 2010a.

KITAMOTO, D.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science,** v. 14, n. 5, p. 315-328, 2009.

KITAMOTO, D.; YANAGISHITA, H.; SHINBO, T.; NAKANE, T.; KAMISAWA, C.; NAKAHARA, T. Surface-active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by candida-antarctica. **Journal of Biotechnology,** v. 29, n. 1-2, p. 91-96, 1993.

KOLOMYTSEVA, M. P.; RANDAZZO, D.; BASKUNOV, B. P.; SCOZZAFAVA, A.; BRIGANTI, F.; GOLOVLEVA, L. A. Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by rhodococcus rhodochrous VKM B-2469. **Bioresource Technology,** v. 100, n. 2, p. 839-844, 2009.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology,** v. 39, n. 4, p. 295-304, 2001.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. **International Journal of Environmental Sciences,** v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA, B. Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 79, n. 6, p. 617-621, 2007.

LAI, C. C.; HUANG, Y. C.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials,** v. 167, n. 1-3, p. 609-614, 2009.

LAMBAIS, M. R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J. C.; BULL, R. C.; RODRIGUES, R. R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science,** v. 312, n. 5782, p. 1917-1917, 2006.

LAMERS, P. **International biodiesel markets:** developments in production and trade. Berlin: UFOP, 2011. 24 p.

LANE, D. J. Nucleic scid techniques. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Bacterial systematics**. New York: John Willey, 1991.

LAWNICZAK, L.; CZACZYK, K.; OWSIANIAK, M.; CHRZANOWSKI, L. Role of rhamnolipids in the natural environment. **Postepy Mikrobiologii,** v. 50, n. 1, p. 17-30, 2011.

LI, Y. M.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. The surfactin and lichenysin isoforms produced by bacillus licheniformis HSN 221. **Analytical Letters,** v. 43, n. 6, p. 929-940, 2010.

LIU, J.; PENG, K.; HUANG, X.; LU, L.; CHENG, H.; YANG, D.; ZHOU, Q.; DENG, H. Application of waste frying oils in the biosynthesis of biodemulsifier by a demulsifying strain Alcaligenes sp S-XJ-1. **Journal of Environmental Sciences-China,** v. 23, n. 6, p. 1020-1026, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal of Biological chemistry,** v. 193, p. 265-275, 1951.

LUNKENHEIMER, K. The effect of contact-angle on ring tensiometry - an experimental-study. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 131, n. 2, p. 580-583, 1989.

MANICKAM, N.; BAJAJ, A.; SAINI, H. S.; SHANKER, R. Surfactant mediated enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by Sphingomonas sp NM05. **Biodegradation,** v. 23, n. 5, p. 673-682, 2012.

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

MAUGERI, T. L.; GUGLIANDOLO, C.; CACCAMO, D.; PANICO, A.; LAMA, L.; GAMBACORTA, A.; NICOLAUS, B. A halophilic thermotolerant Bacillus isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. **Biotechnology Letters,** v. 24, n. 7, p. 515-519, 2002.

MCINTYRE, A. **Life in the World's Oceans:** Diversity, distribution, and abundance. Singapura: Wiley-Blackwell, 2010. 1712p.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of Sao Paulo state, Brazil. **Microbiological Research,** v. 165, n. 6, p. 466-482, 2010.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene,** v. 38, n. 6, p. 732 - 749, 1938.

MISHARA, M.; MUTHUPRASANNA, P.; PRABHA, K. S.; RANI, P. S.; BABU, I. A. S.; CHADIRAN, S.; ARUNACHALAM, G.; SHALINI, S. Basics and potential applications of surfactants - A review. **International Journal of Pharmtech Research**, v. 1, n. 4, p. 1354-1365, 2009.

MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, Y.; IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by arthrobacter sp strain MIS38. **Journal of Bacteriology,** v. 175, n. 20, p. 6459-6466, 1993.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids,** v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Microbial surfactants and their potential applications: an overview. **Biosurfactants,** v. 672, p. 54-64, 2010.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Antimicrobial biosurfactants from marine bacillus circulans: extracellular synthesis and purification. **Letters in Applied Microbiology,** v. 48, n. 3, p. 281-288, 2009.

MULLER, M. M.; KUGLER, J. H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HORMANN, B.; POHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids-next generation surfactants? **Journal of Biotechnology,** v. 162, n. 4, p. 366-380, 2012.

NAJAFI, A. R.; RAHIMPOUR, M. R.; JAHANMIRI, A. H.; ROOSTAAZAD, R.; ARABIAN, D.; SOLEIMANI, M.; JAMSHIDNEJAD, Z. Interactive optimization of biosurfactant production by paenibacillus alvei ARN63 isolated from an iranian oil well. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 82, n. 1, p. 33-39, 2011.

NAKANO, M.; IEHATA, S.; TANAKA, R.; MAEDA, H. Extracellular neutral lipids produced by the marine bacteria marinobacter sp. **Biocontrol Science,** v. 17, n. 2, p. 69-75, 2012.

NARANCIC, T.; KENNY, S. T.; DJOKIC, L.; VASILJEVIC, B.; O'CONNOR, K. E.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by newly isolated Pseudomonas sp TN301 from a wide range of polyaromatic and monoaromatic hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology,** v. 113, n. 3, p. 508-520, 2012.

NAVONVENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from acinetobacter radioresistens. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 61, n. 9, p. 3240-3244, 1995.

NEU, T. R.; HARTNER, T.; PORALLA, K. Surface-active properties of viscosin - a peptidolipid antibiotic. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 32, n. 5, p. 518-520, 1990.

NICOLAUS, B.; PANICO, A.; MANCA, M. C.; LAMA, L.; GAMBACORTA, A.; MAUGERI, T.; GUGLIANDOLO, C.; CACCAMO, D. A thermophilic bacillus isolated from an eolian shallow hydrothermal vent, able to produce exopolysaccharides. **Systematic and Applied Microbiology,** v. 23, n. 3, p. 426-432, 2000.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress,** v. 21, n. 6, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 160, n. 7, p. 2066-2074, 2010.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 35, n. 1-2, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactants: properties and applications. **Quimica Nova,** v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from Bacillus subtilis grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology,** v. 97, n. 2, 2006.

O'CONNOR, R. T.; DUPRÉ, E. F.; MITCHAN, D. Applications of infrared absorption spectroscopy to investigation of cotton and modified cottons. Part I: Physical and crystalline modifications and oxidations. **Textile Research Journal,** v. 28, n. 5, p. 382 - 392, 1958.

ONGENA, M.; JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology,** v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PATEL, M. N.; GOPINATHAN, K. P. Lysozyme-sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 52, n. 5, p. 1224-1226, 1986.

PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F.; KOSARIC, N. Production of sophorolipids from Candida bombicola ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. **Engineering in Life Sciences,** v. 5, n. 4, p. 357-362, 2005.

PENG, F.; WANG, Y.; SUN, F.; LIU, Z.; LAI, Q.; SHAO, Z. A novel lipopeptide produced by a pacific ocean deep-sea bacterium, rhodococcus sp TW53. **Journal of Applied Microbiology,** v. 105, n. 3, p. 698-705, 2008.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999.

PLAZA, G. A.; JANGID, K.; LUKASIK, K.; NALECZ-JAWECKI, G.; BERRY, C. J.; BRIGMON, R. L. Reduction of petroleum hydrocarbons and toxicity in refinery wastewater by bioremediation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 81, n. 4, p. 329-333, 2008.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic dna from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics,** v. 11, n. 6, p. 217-218, 1995.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Short communication: Production and properties of a biosurfactant synthesized by Arthrobacter protophormiae - An Antarctic strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v. 13, n. 1, p. 137-139, 1997.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants - review. **Biotechnology,** v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.

REDDY, M. S.; NARESH, B.; LEELA, T.; PRASHANTHI, M.; MADHUSUDHAN, N. C.; DHANASRI, G.; DEVI, P. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of brevibacillus sp. **Bioresource Technology,** v. 101, n. 20, p. 7980-7983, 2010.

REDDY, P. G.; ALLON, R.; MEVARECH, M.; MENDELOVITZ, S.; SATO, Y.; GUTNICK, D. L. Cloning and expression in escherichia-coli of an esterase-coding gene from the oil-degrading bacterium acinetobacter-calcoaceticus rag-1. **Gene,** v. 76, n. 1, p. 145-152, 15 1989.

REISFELD, A.; ROSENBER.E; GUTNICK, D. Microbial degradation of crude-oil - factors affecting dispersion in sea-water by mixed and pure cultures. **Applied Microbiology,** v. 24, n. 3, p. 363-&, 1972.

REPORTLINKER. **Surfactants market by product types [anionic, non-ionic, cationic, amphoteric], substrates [synthetic/petrochemical, bio-based/ natural/green], geography & applications – global industry trends and forecasts to 2017**. Dallas: Global Industry Analysts, 2012. p. 98.

RIVERA, O. M. P.; MOLDES, A. B.; TORRADO, A. M.; DOMINGUEZ, J. M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry,** v. 42, n. 6, p. 1010-1020, 2007.

ROBERGS, R. A.; GRIFFIN, S. E. Glycerol - biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. **Sports Medicine,** v. 26, n. 3, p. 145-167, 1998.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology,** v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology,** v. 13, n. 3, p. 249-252, 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; GOTTLIEB, A.; ROSENHAK, S.; RON, E. Z. Production of biodispersan by acinetobacter-calcoaceticus A2. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 54, n. 2, p. 317-322, 1988.

ROSENBERG, E.; ZUCKERBERG, A.; RUBINOVITZ, C.; GUTNICK, D. L. Emulsifier of arthrobacter rag-1 - isolation and emulsifying properties. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 37, n. 3, p. 402-408, 1979.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 97, n. 3, p. 1005-1016, 2013.

SAEKI, H.; SASAKI, M.; KOMATSU, K.; MIURA, A.; MATSUDA, H. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by Gordonia sp strain JE-1058. **Bioresource Technology,** v. 100, n. 2, p. 572-577, 2009.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic engineering and biotechnology journal**, p. 1-14, 2012.

SAIKIA, R. R.; DEKA, S.; DEKA, M.; SARMA, H. Optimization of environmental factors for improved production of rhamnolipid biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa RS29 on glycerol. **Journal of Basic Microbiology,** v. 52, n. 4, p. 446-457, 2012.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances,** v. 28, n. 4, p. 436-450, 2010a.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology,** v. 30, n. 2, p. 127-144, 2010c.

SATPUTE, S. K.; BHUYAN, S. S.; PARDESI, K. R.; MUJUMDAR, S. S.; DHAKEPHALKAR, P. K.; SHETE, A. M.; CHOPADE, B. A. Molecular genetics of biosurfactant synthesis in microorganisms. **Biosurfactants,** v. 672, p. 14-41, 2010b.

SCHULZ, D.; PASSERI, A.; SCHMIDT, M.; LANG, S.; WAGNER, F.; WRAY, V.; GUNKEL, W. Marine biosurfactants: screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the north-sea. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences,** v. 46, n. 3-4, p. 197-203, 1991.

SEDDON, B.; MCHUGH, R. C.; SCHMITT, A. Brevibacillus brevis - a novel candidate biocontrol agent with broad-spectrum antifungal activity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PESTS AND DISEASES, 2000, Callno. **Anais…** Brighton: British Crop Protection Council, 2000. p.563-570.

SEKHON, K. K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity. **Journal Petroleum & Environmental Biotechnology,** v. 3, n. 7, p. 3-10, 2012.

SHAKERIFARD, P.; GANCEL, F.; JACQUES, P.; FAILLE, C. Effect of different bacillus subtilis lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of bacillus cereus 98/4 spores to stainless steel and Teflon. **Biofouling,** v. 25, n. 6, p. 533-541, 2009.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin - a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food Technology and Biotechnology,** v. 48, n. 2, p. 119-134, 2010.

SHEN, H. H.; LIN, T. W.; THOMAS, R. K.; TAYLOR, D. J. F.; PENFOLD, J. Surfactin structures at interfaces and in solution: the effect of ph and cations. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 115, n. 15, p. 4427-4435, 2011.

SHETE, A. M.; WADHAWA, G.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 65, n. 2, p. 91-115, 2006.

SIDAL, U.; OZKALE-TASKIN, E. Rhamnolipid production from olive oil mill effluent (OOME) using the rotating biodisc reactor. **Biologia,** v. 58, n. 6, p. 1081-1086, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p.301-340.

SINGER, M. E.; FINNERTY, W. R.; BOLDON, P.; KING, A. D. Characterization of a biosurfactant effective in the viscosity reduction of heavy oil. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society,** v. 185, p. 55-60, 1983.

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

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; SAMANTA, R.; SEN, R. High-performance liquid chromatography purification of biosurfactant isoforms produced by a marine bacterium. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** v. 395, n. 3, p. 845-854, 2009.

SOARES, M. M. S. R.; RIBEIRO, M. C. **Microbiologia prática roteiro e manual:** bactérias e fungos. São Paulo: Atheneu, 2002. 97 p.

SOUSA, M.; MELO, V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H. B.; GONCALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant-producing bacillus strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** v. 35, n. 6, p. 897-906, 2012.

STANKOVIC, S.; MIHAJLOVIC, S.; DRAGANIC, V.; DIMKIC, I.; VUKOTIC, G.; BERIC, T.; FIRA, D. Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of bacillus sp. **Archives of Biological Sciences,** v. 64, n. 4, p. 1425-1432, 2012.

STUMM, W. **Aquatic Chemistry - an introduction emphasizing chemical equilibria in natura waters.** New York: Wiley, 1981. 569.

SUTYAK, K. E.; WIRAWAN, R. E.; AROUTCHEVA, A. A.; CHIKINDAS, M. L. Isolation of the bacillus subtilis antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived Bacillus amyloliquefaciens . **Journal of Applied Microbiology,** v. 105, n. 6, p. 2255-2255, 2008.

SYAKTI, A. D.; YANI, M.; HIDAYATI, N. V.; SIREGAR, A. S.; DOUMENQ, P.; SUDIANA, I. M. M. The bioremediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria isolated from a mangrove contaminated by petroleum hydrocarbons on the cilacap coast, Indonesia. **Bioremediation Journal,** v. 17, n. 1, p. 11-20, 2013.

TA-CHEN, L.; CHANG, J. S.; YOUNG, C. C. Exopolysaccharides produced by gordonia alkanivorans enhance bacterial degradation activity for diesel. **Biotechnology Letters,** v. 30, n. 7, p. 1201-1206, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution,** v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THAMPURAN, S. K.; GOPAKUMAR, K. Freezing temperature and freezing menstruum on the survival of selected marine bacteria. **Fishery Rechnology,** v. 30, p. 139-146, 1993.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. Biosurfactant production by corynebacterium kutscheri from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology,** v. 45, n. 6, p. 686-691, 2007.

THAVASI, R.; NAMBARU, V.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant production by azotobacter chroococcum isolated from the marine environment. **Marine Biotechnology,** v. 11, n. 5, p. 551-556, 2009.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research,** v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TRIBELLI, P. M.; RAIGER IUSTMAN, L. J.; CATONE, M. V.; DI MARTINO, C.; REVALE, S.; MENDEZ, B. S.; LOPEZ, N. I. Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer pseudomonas extremaustralis, a highly stress-resistant antarctic bacterium. **Journal of Bacteriology,** v. 194, n. 9, p. 2381-2382, 2012.

TUGRUL, T.; CANSUNAR, E. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. **World Journal of Microbiology & Biotechnology,** v. 21, n. 6-7, p. 851-853, 2005.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; DE CARVALHO, C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation,** v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 276, n. 2, p. 456-464, 2004.

URUM, K.; GRIGSON, S.; PEKDEMIR, T.; MCMENAMY, S. A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. **Chemosphere,** v. 62, n. 9, p. 1403-1410, 2006.

VAIDEHI, K.; KULKARNI, S. D. Microbial remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: an overview. **Research Journal of Chemistry and Environment,** v. 16, n. 4, p. 200-212, 2012.

VAN DER MERWE, P.; LANNUZEL, D.; NICHOLS, C. A. M.; MEINERS, K.; HEIL, P.; NORMAN, L.; THOMAS, D. N.; BOWIE, A. R. Biogeochemical observations during the winter-spring transition in East Antarctic sea ice: Evidence of iron and exopolysaccharide controls. **Marine Chemistry,** v. 115, n. 3-4, p. 163-175, 2009.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects - Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances,** v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.

VANDYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances,** v. 9, n. 2, p. 241-252, 1991.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA, V. Glycolipids produced by antarctic nocardioides sp during growth on n-paraffin. **Process Biochemistry,** v. 40, n. 7, p. 2387-2391, 2005.

VASILEVA-TONKOVA, E.; GESHEVA, V. Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe pantoea sp during growth on hydrocarbons. **Current Microbiology,** v. 54, n. 2, p. 136-141, 2007.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by bacillus subtilis MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering,** v. 28, n. 2, p. 175-180, 2011.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation,** v. 8, n. 6, p. 401-417, 1997.

VYAS, T. K.; DAVE, B. P. Production of biosurfactant by nocardia otitidiscaviarum and its role in biodegradation of crude oil. **International Journal of Environmental Science and Technology,** v. 8, n. 2, p. 425-432, 2011.

WADEKAR, S.; KALE, S.; LALI, A.; BHOWMICK, D.; PRATAP, A. Sophorolipid production by starmerella bombicola (ATCC 22214) from virgin and waste frying oils, and the effects of activated earth treatment of the waste oils. **Journal of the American Oil Chemists Society,** v. 89, n. 6, p. 1029-1039, 2012.

WONG, J. W. C.; ZHAO, Z.; ZHENG, G. Biosurfactants from acinetobacter calcoaceticus bu03 enhance the bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE ON SOILS, SEDIMENTS, WATER AND ENERGY, 26., 2010, Amherst. **Anais…** Amherst: Curran Associates, 2011. p.35-51.

WU, Y. H.; LAI, Q. L.; ZHOU, Z. W.; QIAO, N.; LIU, C. L.; SHAO, Z. Z. Alcanivorax hongdengensis sp nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 59, p. 1474-1479, 2009.

YAKIMOV, M. M.; GOLYSHIN, P. N.; LANG, S.; WAGNER, F.; MOORE, E.; ABRAHAM, W. R.; TIMMIS, K. N. New moderate halophilic marine strain MM1 produces novel class of biosurfactants. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON EXTREMOPHILES, 1., 1996, Estoril. **Resumos…** Estoril: International Society for Extremophiles, 1994. ref. 182.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods,** v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZHANG, X. S.; XU, D. J.; ZHU, C. Y.; LUNDAA, T.; SCHERR, K. E. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading Pseudomonas aeruginosa strains. **Chemical Engineering Journal,** v. 209, p. 138-146, 2012.

ZHU, Z.-Q.; YANG, X.-E.; WANG, K.; HUANG, H.-G.; ZHANG, X.; FANG, H.; LI, T.-Q.; ALVA, A. K.; HE, Z.-L. Bioremediation of Cd-DDT co-contaminated soil using the Cd-hyperaccumulator Sedum alfredii and DDT-degrading microbes. **Journal of Hazardous Materials,** v. 235, p. 144-151, 15 2012.

ZOLLER, U; SOSIS, P. Handbook of Detergentes: part f: production. New York: CRC Press, 2009. 593 p.