Claudia Patricia Marin Abadia

Utilização do licor proveniente da hidrólise da polpa de sisal como substrato para a produção de biossurfatante.

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Nitschke

São Carlos

2014

AGRADECIMENTOS

- À agência de fomento Capes;
- Ao Instituto de Química de São Carlos;
- À professora Marcia Nitschke pela orientação;
- Ao Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas do Instituto de Química de São Carlos-USP, pelo fornecimento dos substratos; á professora Elisabete Frollini e Joice Jaqueline Kaschuk por toda sua colaboração;
- Ao Núcleo de Pesquisa em Ciência e Tecnologia de Biorecursos – CITECBIO, pelo apoio financeiro;
- Aos amigos que fiz durante essa trajetória, funcionários, professores e alunos do Campus de São Carlos;
- A meus amigos da Colômbia em São Carlos;
- Especialmente a minha família

En el último análisis llegamos a la esfera de la eternidad, a ese límite extremo a que llega la razón humana en cada orden del pensamiento cuando se trata seriamente un tema.

León Tolstoi.

RESUMO

Utilização do licor proveniente da hidrólise da polpa de sisal como substrato para a produção de biossurfatante

Os surfatantes são substâncias químicas que têm uma ampla aplicação industrial principalmente como matéria-prima na fabricação de detergentes. No entanto, estas substâncias de origem sintética podem ser substituídas por biossurfatantes (BS), já que estes são biodegradáveis, menos tóxicos para o meio ambiente e além de estáveis em condições extremas de pH, temperatura e salinidade. O alto custo de produção dos BS inviabiliza até o presente momento a substituição dos surfatantes químicos (mais tóxicos). Pesquisadores acreditam que a produção de BS tenha que atingir custos abaixo de 5 dólares/lb para serem economicamente viáveis. Uma das estratégias usadas para diminuir o custo da produção de BS, é usar diferentes subprodutos agrícolas e industriais. Os resíduos de natureza celulósica vêm ganhando espaço nos últimos anos como fontes de carbono alternativas para produtos de base biotecnológica, devido principalmente a sua abundância na natureza e ao apelo das tecnologias sustentáveis. O sisal é uma fonte lignocelulósica de rápido ciclo de crescimento que contém alto teor de celulose vegetal, e que é encontrado em grandes quantidades no Brasil. Este projeto teve como objetivo a produção de biossurfatante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, utilizando como fonte de carbono o hidrolisado lignocelulósico ácido e enzimático obtido da polpa de sisal. A produção do BS no substrato alternativo proposto foi comparada com a produção em meio de cultivo convencional (glicose). Os BS sintetizados foram avaliados quanto às propriedades físico-químicas: concentração micelar crítica (CMC), tensão superficial (TS) e tensão interfacial (TI). O BS obtido a partir da fermentação do hidrolisado enzimático apresentou TS = 28,71 mN.m⁻¹; TI = 3,81 mN.m⁻¹; e CMC = 64,0 mg.L⁻¹; e aquele produzido a partir da fermentação do hidrolisado ácido apresentou TS = 29,79 mN.m⁻¹; TI = 5,70 mN.m⁻¹; e CMC = 1394,0 mg.L⁻¹. Os valores de tensão superficial inferiores a 30 mN.m⁻¹ indicaram que o hidrolisado ácido e enzimático da polpa de sisal oferecem boas condições como substratos alternativos para a produção de surfactina. As soluções dos BS obtidos em hidrolisado ácido e enzimático removeram 79,96% e 70,35% do óleo diesel de areia contaminada respectivamente, evidenciando-se o potencial para biorremediação.

PALAVRAS CHAVES: *Bacillus subtilis*, biossurfatante, celulose, sisal, surfactina.

ABSTRACT

Utilization of the liquor of sisal pulp hydrolysis as substrate for the biosurfactant production

The surfactants are chemical products that have huge industrial applications, mainly as raw materials in detergent industry. However, these synthetic substances can be replaced by biosurfactants (BS), since they are biodegradable, less toxic and stable at a wide range of pH, temperature and salt concentrations. In spite of these favorable characteristics, the high production costs of BS difficult their use as substitutes to synthetic surfactants (more toxic). If the production costs were less than 5 dollar/lb, their commercialization of BS would be possible. One strategy that permits reducing costs is the use of alternatives substrates from different industries such as byproducts or wastes from agricultural processing units. The lignocellulosic residues are one the most abundant sources of renewable organic carbon, for this reason in the last years, they began to be used as an unconventional carbon source for the synthesis of biotechnology products. Sisal is a lignocellulosic source that grows rapidly and is found in high quantity in Brazil. The objective of this study was the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ATCC 21332, using as carbon source enzymatic and acid hydrolysates obtained from sisal pulp. The production using the alternative substrates was evaluated and compared with the production in conventional medium. The critical micelle concentration (CMC), surface tension (TS) and interfacial tension (IT) of the BS were evaluated, the following values were obtained for surfactin synthesized through the fermentation with enzymatic hydrolysate: TS = 28.71 mN.m⁻¹, TI = 3.81 mN.m⁻¹ and CMC = 64.0 mg.L⁻¹. When the acid hydrolysate was used as carbon source the physical-chemical properties were TS = 29.78 mN.m⁻¹, TI = 5.70 mN.m⁻¹ and CMC = 1394.0 mg.L⁻¹. Surface tension values lower than 30.0 mN.m⁻¹ demonstrated that enzymatic and acid hydrolysate offer good conditions as alternative substrates for biosurfactant production. The surfactin synthesized exhibited potential for bioremediation; washing soil with BS obtained in acid and enzymatic hydrolysate removed 80% and 70% of diesel from contaminated sand, respectively.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biosurfactant, cellulose, sisal, surfactin.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Biossurfatantes	5
2.1.1 Classificação e natureza química.....	5
2.1.2 Principais propriedades.....	8
2.2 Aplicações Industriais	8
2.2.1 Biorremediação	10
2.2.2 Recuperação terciária do petróleo (MEOR)	12
2.2.3 Limpeza de reservatórios de lodos de óleos	12
2.2.4 Biossurfatantes na agricultura	13
2.2.5 Aplicações terapêuticas	14
2.2.6 Indústria de alimentos	15
2.2.7 Outras aplicações.....	16
2.3 Produção	16
2.4 Biossurfatantes produzidos pelo gênero <i>Bacillus</i>	19
2.5 Surfactina.....	21
2.5.1 Características da surfactina.....	21
2.5.2 Produção de surfactina	23
2.6 Substratos lignocelulósicos.....	24
2.6.1 Sisal	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Micro-organismos	31
4.2 Meios de cultura	31
4.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo.....	34
4.4 Determinação de crescimento bacteriano e atividade tensoativa	34
4.4.1 Determinação do número de células viáveis.....	34
4.4.2 Determinação da Tensão Superficial	35
4.4.3 Determinação da Diluição Micelar Crítica (CMD)	35
4.5 Determinação de açúcares	36
4.5.1 Determinação de açúcar redutor total	36

4.5.2 Determinação de carboidratos totais	36
4.5.3 Determinação de glicose	36
4.5.4 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC)	36
4.6 Extração e semi-purificação do biossurfatante produzido.....	37
4.6.1 Concentração de biossurfatante bruto	37
4.6.2 Semi-purificação da surfactina sintetizada	38
4.7 Caracterização do BS quanto às propriedades físicas e composição química	38
4.7.1 Determinação da Tensão Interfacial.....	38
4.7.2 Concentração Micelar Crítica (CMC).....	38
4.7.3 Espectrometria de massa.....	39
4.8 Aplicações	39
4.8.1 Potencial para biorremediação.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Análise comparativa da cinética de produção de BS nos três meios propostos	41
5.1.1 Crescimento bacteriano	41
5.1.2 pH e Diluição micelar crítica	45
5.1.3 Concentração micelar crítica	48
5.1.4 Determinação e uso de açúcares.....	51
5.1.5 Cinética de produção dos biossurfatantes	54
5.2 Extração e rendimento de surfactina	61
5.3 Comparação com outros meios lignocelulosicos	62
5.4 Espectrometria de massas	63
5.5 Aplicações do biossurfatante obtido	68
6 CONCLUSÕES	72
7 PERSPECTIVAS.....	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática de uma molécula de surfatante (a) e acúmulo do BS na interface entre dois meios imiscíveis (b)	3
Figura 2- Mistura de dois líquidos imiscíveis antes e depois de adicionar um BS.....	4
Figura 3- (a) Representação esquemática de uma molécula de surfatante em água, porção hidrofóbica (azul); porção hidrofílica (vermelho); (b) variação da tensão superficial com o logaritmo da concentração de surfatante e valor da CMC.....	5
Figura 4- Estrutura química de alguns dos principais BS (a) surfactina; (b) emulsan; (c) soforolipídeo; (d) ramnolipídeo; e) trealolipídeo.	7
Figura 5- Representação esquemática da posição do ácido graxo (vermelho) em (a) iturina; (b) colistina	20
Figura 6- <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 após coloração de Gram	21
Figura 7- Estrutura dos membros representativos da família da surfactina sintetizada pelo gênero <i>Bacillus</i>	22
Figura 8- A imagem da direita é a planta de sisal e a imagem da esquerda é a polpa celulósica moída usada neste estudo	28
Figura 9- Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 em ágar nutriente	31
Figura 10- Aspecto do licor resultante da hidrólise enzimática (direita) e ácida (esquerda)	32
Figura 11- Representação esquemática da diluição sucessiva para contagem do número de células viáveis	35
Figura 12- Contagem de células viáveis de <i>Bacillus subtilis</i> em ágar nutriente	35
Figura 13- Crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> em meio contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático como fontes de carbono	43
Figura 14- Espectro HPLC do meio de hidrolisado ácido que evidencia a presença de furfural	44
Figura 15- Representação esquemática da formação e transformação de furfural e HMF	44
Figura 16- Variação do pH do meio de cultura contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático	47
Figura 17- Valores de CMD^{-1} do meio de cultura contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático	47

Figura 18- Valores de CMD ⁻² do meio de cultura contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático	48
Figura 19- Determinação da CMC para a surfactina obtida em a) meio contendo hidrolisado enzimático, através do método do anel de Du Nöuy; b) meio contendo hidrolisado ácido, através de diluições sucessivas do meio de cultura	50
Figura 20- Polpa celulósica antes da hidrólise (esquerda); licor da hidrólise ácida e enzimática (direita)	52
Figura 21- Cromatograma de determinação de açúcares do meio contendo hidrolisado enzimático de celulose de sisal.....	53
Figura 22- Cinética de produção de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i> em meio contendo hidrolisado enzimático de celulose de sisal. a) Crescimento celular, consumo de açúcares, pH e TS b) CMD e TS.....	56
Figura 23- Cinética de produção de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i> cultivada em meio contendo hidrolisado ácido de celulose de sisal. a) Crescimento celular, consumo de açúcares, pH e TS b) CMD e TS.....	57
Figura 24- Cinética de produção de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i> cultivada em meio contendo glicose. a) Crescimento celular, consumo de açúcares, pH e TS b) CMD e TS.....	58
Figura 25- Consumo de açúcares redutores totais por <i>Bacillus subtilis</i> nos diferentes meios testados	59
Figura 26- Surfactina bruta obtida em meio de cultura contendo (a) hidrolisado ácido; (b) hidrolisado enzimático de sisal	62
Figura 27- Surfactina semi-purificada obtida em meio de cultura contendo (a) hidrolisado ácido; (b) hidrolisado enzimático de sisal.....	62
Figura 28- (a) Espectrometria de massas (ESI) da amostra de surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> em hidrolisado enzimático de polpa de sisal; (b) expansão do espectro de massas (ESI) na faixa 1042-1065 m/z.....	65
Figura 29- Espectrometria de massas (ESI) da amostra do padrão de surfactina	66
Figura 30- (a) Espectrometria de massas (ESI) da amostra de surfactina produzida por <i>Bacillus subtilis</i> em hidrolisado ácido de polpa de sisal (a) na faixa 1022-1045 m/z; (b) na faixa 1037-1060 m/z.....	67

Figura 31- Representação esquemática mostrando o ácido graxo e a sequência do peptídeo dos íons moleculares formados pela fragmentação da surfactina onde n pode ser 13, 14 ou 15 C	68
Figura 32- Soluções usadas para a lavagem do solo contaminado com biodiesel, a direita surfatante obtido com hidrolisado ácido e a esquerda com hidrolisado enzimático	70
Figura 33- Água de lavagem do solo contaminado, lavagem com solução de surfactina produzida em (a) hidrolisado enzimático; (b) hidrolisado ácido	71
Figura 34- Coloração da areia limpa - controle (a), contaminada (b) e depois da lavagem (c).....	71
Figura 35- Aspecto dos aglomerados na areia contaminada com diesel depois de 24 horas de agitação com solução de BS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais biossurfatantes e sua origem microbiana	6
Tabela 2- Organismos produtores de BS e suas aplicações.....	9
Tabela 3- Comparação do crescimento celular de <i>Bacillus subtilis</i> em meio contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático.	43
Tabela 4- Comparação de tensão superficial (TS), diluição micelar crítica (CMD) e pH para o processo de produção de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i> nos diferentes substratos propostos	46
Tabela 5- Comparação de tensão superficial (TS), interfacial (TI) e CMC para surfactina produzida em hidrolisado ácido e enzimático	49
Tabela 6- Concentração de carboidratos totais, açúcares redutores, glicose e xilose no meio contendo hidrolisado enzimático de sisal	53
Tabela 7- Tensão superficial (TS) e consumo de açúcares redutores totais (AR) por <i>Bacillus subtilis</i> crescendo em meio contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático	55
Tabela 8- Extrato bruto de BS obtida em diversos tempos	61
Tabela 9- Designação dos principais íons presentes na surfactina.....	64

1 INTRODUÇÃO

Os surfatantes são substâncias químicas que têm uma ampla aplicação industrial principalmente como matéria-prima na fabricação de detergentes. No entanto, estas substâncias de origem sintética, as quais algumas vezes são recalcitrantes, podem ser substituídas por biossurfatantes (BS), já que estes são biodegradáveis, menos tóxicos para o meio ambiente e estáveis em condições extremas de pH, temperatura e salinidade (BANAT et al., 2010; DEVELTER; LAURYSEN, 2010).

Os BS são sintetizados por diferentes organismos vivos, sendo uma classe única de produtos de origem natural que apresentam atividade de superfície. Os micro-organismos são os principais produtores dos BS, sendo sintetizados principalmente como metabólitos secundários. Estes compostos são geralmente usados para facilitar a difusão passiva de substâncias imiscíveis em água para o interior da célula (TREVISAN, 2012).

As bactérias formam o grupo de destaque na produção de biossurfatantes, os ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa*, a surfactina de *Bacillus subtilis* e o emulsan de *Acinetobacter calcoaceticus* estão entre os mais importantes (RAHMAN; GAKPE, 2008).

O alto custo de produção dos BS atualmente inviabiliza a substituição dos surfatantes químicos (mais tóxicos). Entretanto, se a produção de BS fosse competitiva em relação aos sintéticos, aumentando sua disponibilidade, o uso comercial poderia apresentar crescimento significativo nas próximas décadas (DAS; MUKHERJEE, 2007). O baixo rendimento e os elevados custos das matérias-primas e da purificação dos BS são os principais desafios a serem vencidos para tornar a produção dos BS viável (WAN; JAMAL; ALAM, 2010).

Muitos esforços tem sido realizados visando a melhoria na produção tecnológica dos BS, o que tem resultado num aumento de 10-20 vezes na produtividade dos BS. Entretanto, estudos ainda são necessários para alcançar condições de produtividade vinculadas a métodos de recuperação e purificação mais eficientes. (MUTHUSAMY et al., 2008). Pesquisadores acreditam que a produção de BS tenha que atingir custos abaixo de 5 dólares/lb para se tornar economicamente viáveis (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Em relação à matéria-prima, as fontes de carbono e nitrogênio podem representar aproximadamente a metade do custo total de produção de BS. Como exemplo, a produção de ramnolipídeos (RL) gera em média 0,1-0,62 g de RL por grama de substrato, e a quantidade de substrato consumida durante o processo de produção é maior que a quantidade de RL sintetizada, portanto, o uso de substratos baratos afeta dramaticamente o custo da produção dos BS (HENKEL et al., 2012).

Uma das estratégias usadas para diminuir o custo da produção de BS, é usar diferentes subprodutos agrícolas e industriais, bem como resíduos (WAN; JAMAL; ALAM, 2010; DELEU; PAQUOT, 2004). Entre estes, se destacam o melaço, o soro de leite, a manipueira e os resíduos do refino de óleos de vegetais (O'TOOLE, 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2004a; NITSCHKE et al., 2005a; COSTA et al., 2009). Os resíduos de natureza celulósica vêm ganhando espaço nos últimos anos como fontes alternativas de carbono para produtos obtidos a partir de processos biotecnológicos, devido principalmente a sua abundância na natureza e às exigências das tecnologias sustentáveis (HENKEL et al., 2012). O licor proveniente da hidrólise ácida e enzimática de polpa de sisal foi usado neste trabalho como um substrato alternativo na produção de BS. O principal objetivo foi avaliar o potencial destes substratos para a produção de surfactina utilizando a linhagem *Bacillus subtilis* ATCC 21332.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os biossurfactantes são compostos biológicos com características anfífilas que são produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular de leveduras, bactérias e fungos filamentosos. Apesar da maioria dos BS serem considerados metabólitos secundários, alguns apresentam papel essencial para a sobrevivência dos micro-organismos, facilitando o transporte dos nutrientes ou atuando como agentes antimicrobianos (DEHGHAN-NOUDEH; HOUSAINDOKH; BAZZAZ, 2005; FERNANDES et al., 2007). As funções biológicas atribuídas aos BS referem-se ao aumento da área superficial, à biodisponibilidade dos substratos hidrofóbicos, à ligação a metais pesados, à patogênese e à formação de biofilmes (RODRIGUES et al., 2006; KAVAMURA; ESPOSITO, 2010; HOFFIMAN et al., 2010; GAUMAM; TIAGI, 2006; SIMOES; SIMOES; VIEIRA, 2010).

Os BS são formados por uma porção hidrofóbica e outra porção hidrofílica (figura 1a). A cadeia hidrofílica geralmente é formada por grupos tais como álcoois,

carboidratos, ácidos carboxílicos, peptídeos ou fosfatos. Entretanto a parte hidrofóbica é principalmente formada por ácidos graxos saturados ou insaturados (MISHRA et al., 2009). Os BS acumulam-se entre dois fluidos imiscíveis ou entre um fluido e um sólido (figura 1b). Esta característica leva a redução da tensão superficial (líquido-ar) e interfacial (líquido-líquido), reduzindo as forças de repulsão entre as fases imiscíveis (figura 2). Essa redução aumenta a solubilidade, a mobilidade e a biodisponibilidade de compostos orgânicos fazendo com que esses biossurfatantes apresentem excelentes características espumante, emulsificante, dispersante e de detergência (DE FARIA et al., 2011; GHARAEI, 2011).

Os BS mais potentes podem diminuir a tensão superficial (TS) da água de 72 a 30 mN.m^{-1} e a tensão interfacial entre água e n-hexadecano de 40 a 1 mN.m^{-1} (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Figura 1- Representação esquemática de uma molécula de surfatante (a) e acúmulo do BS na interface entre dois meios imiscíveis (b)

Figura 2- Mistura de dois líquidos imiscíveis antes e depois de adicionar um BS

Em uma concentração cujo número de moléculas de tensoativo por volume seja superior a um determinado valor, são incentivados os choques entre as moléculas, aumentando a probabilidade de organização destas em sistemas mais estáveis termodinamicamente (DALTIM, 2011). Essas estruturas são conhecidas como micelas, e podem adotar formas bastante diferenciadas, dependendo da estrutura e da concentração de tensoativo na solução (DALTIM, 2011). A força motriz que favorece a formação de micelas em água é o efeito hidrofóbico. Nesse processo, a parte hidrofóbica (apolar) ficará protegida dentro da micela e a parte hidrofílica (polar) estará em contato com o meio aquoso (BIRDI, 2010) (figura 3a). Também podem se formar micelas reversas, as quais são formações espontâneas e reversíveis de agregados esféricos de moléculas anfifílicas dispersas em solventes orgânicos hidrofóbicos; a parte polar das moléculas do tensoativo são direcionadas para o interior, formando centros aquosos, e as partes apolares são orientadas para o meio hidrofóbico (MOHD-SETAPAR; 2009).

Para cada tipo de tensoativo existe uma concentração na qual todas as superfícies já estão ocupadas e a quantidade de tensoativo excedente atinge uma concentração mínima necessária para o início da formação de micelas. Como consequência a tensão superficial não é alterada pela adição de mais tensoativo, essa concentração é chamada de concentração micelar crítica (CMC) (figura 3b) (DALTIM, 2011).

Figura 3- (a) Representação esquemática de uma molécula de surfatante em água, porção hidrofóbica (azul); porção hidrofílica (vermelho); (b) variação da tensão superficial com o logaritmo da concentração de surfatante e valor da CMC

2.1 Biossurfatantes

2.1.1 Classificação e natureza química

Os biossurfatantes são classificados de acordo com sua estrutura química e o organismo que os produz. Eles estão constituídos por estruturas como peptídeos, glicopeptídeos, ácidos graxos, glicolipídeos e fosfolipídeos (RAMHAN; GAKPE, 2008). Alguns exemplos dos princípios BS, suas estruturas e os micro-organismos envolvidos na sua produção são mostrados na tabela 1 e figura 4.

I. Glicolipídeos: são carboidratos ligados com ácidos hidroxi-alifáticos e alifáticos de cadeias longas. Os mais conhecidos são ramnolipídeos, soforolipídeos, trehalolipídeos. Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são os glicolipídeos de maior destaque, sendo sua produção já explorada comercialmente em alguns países (MORITA et al., 2008; SINGH; BHARALI; KUMAR, 2013a; THANOMSUB et al; 20).

II. Lipoproteínas e lipopeptídeos: nesta classe destacam-se os lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. particularmente a surfactina (GHARAEI, 2011; ARIMA et al., 1968).

Tabela 1- Principais biossurfatantes e sua origem microbiana

Tipo de Biossurfatante	Microrganismos
Glicolipídeos	
- rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i>
- trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfatantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfatantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte: DESAI, J. D.; BANAT, I. M, 1997, p. 49.

III. Ácidos graxos e fosfolipídeos: são produzidos por diferentes bactérias e leveduras durante seu crescimento em n-alcanos. Os ácidos graxos podem ser de cadeias lineares ou ramificadas com grupos alquilas e hidroxilas. Os ácidos graxos saturados mais potentes são compostos por C₁₂-C₁₄. Os fosfolipídeos são encontrados nas membranas microbianas (REHN; REIFF, 1981; ROSENBERG; RON, 1999).

IV. Biossurfatantes poliméricos: os mais pesquisados são emulsan, liposan, e complexos de polissacarídeos-proteínas (DESAI; BANAT, 1997).

V. Biossurfatantes particulados: algumas células microbianas apresentam elevada hidrofbicidade superficial, sendo consideradas por si só como BS, entre estes encontram se micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos (HC) como algumas espécies de *Cyanobacteria*. Bactérias do gênero *Acinetobacter* sp. formam

vesículas de membrana extracelular que são formadas de proteínas, fosfolipídios e lipopolisacarídeos. Estas vesículas formam microemulsões com hidrocarbonetos, tendo função importante na captação de alcanos para a célula (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Figura 4- Estrutura química de alguns dos principais BS (a) surfactina; (b) emulsan; (c) soforolipídeo; (d) ramnolipídeo; e) trealolipídeo.

2.1.2 Principais propriedades

Os BS apresentam algumas características que fazem a eles destacar-se sobre os surfatantes sintéticos, dentro destas podem considerar-se as seguintes:

I. Atividade superficial e interfacial: os biossurfatantes são mais efetivos que os surfatantes sintéticos, sendo que os mais potentes diminuem a tensão superficial da água de 72 a 25 mN.m⁻¹. Além disso, regulam as propriedades da superfície celular, permitindo a união ou liberação das células em sítios específicos de acordo as suas necessidades, visando aproximação em habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se distanciar de ambientes desfavoráveis.

II. São biodegradáveis (LIMA et al., 2011a).

III. Alguns biossurfatantes não são afetados por altas temperaturas, salinidade e força iônica, uma vez que muitas bactérias vivem em habitats com condições extremas (CHEN; CHEN; JUANG, 2008).

IV. Apresentam menor toxicidade que os surfatantes sintéticos (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

V. Formação e rompimento de emulsões: os biossurfatantes de alto peso molecular são excelentes agentes emulsificantes, propriedade muito importante para seu uso na indústria cosmética e de alimentos (MUKHERJEE; DAS; SEM, 2006). Os BS geralmente possuem capacidade emulsificante, mas os bioemulsificantes não necessariamente reduzem a tensão superficial (ROSENBERG; RON, 1999).

VI. Possuem alta especificidade, dado que têm uma grande diversidade química que permite selecioná-los com propriedades específicas para uma determinada aplicação (MUKHERJEE; DAS; SEM, 2006).

VII. Podem ser sintetizados a partir de recursos renováveis, evitando a dependência dos derivados do petróleo (HENKEL, et al., 2012).

VIII. Podem ser modificados geneticamente para melhorar suas funções (ZHAO et al., 2012).

2.2 Aplicações Industriais

O aumento da preocupação ambiental e o maior nível de exigência das legislações em diferentes países, impulsionaram estudos para possível substituição

de tensoativos sintéticos por biossurfatantes, os quais possuem origem biológica, apresentando maior biocompatibilidade com o ambiente, além de biodegradabilidade e menor toxicidade. Os BS são usados principalmente para recuperação melhorada do petróleo (MEOR), remoção de metais pesados e biorremediação de hidrocarbonetos (RAHMAN et al, 2006). Também podem ser aplicados na indústria de alimentos, agrícola, cosmética e farmacêutica, na formação e estabilização de emulsões, como agentes antimicrobianos e anti-adesivos (BANAT et al., 2010).

Alguns exemplos das aplicações dos biossurfatantes são apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Organismos produtores de BS e suas aplicações

Organismos	Aplicações
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 3C-9	Limpeza por vazamento de petróleo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S2	Biorremediação de solos contaminados por petróleo
<i>Pseudozyma graminicola</i> CBS 10092	Detergentes
<i>Pseudomonas libanensis</i> M9-3	Aplicações biomédicas e ambientais
<i>Bacillus subtilis</i> ZW-3	Fármacos, proteção ambiental, cosméticos e recuperação de petróleo
<i>Bacillus subtilis</i> BS5	Biorremediação de hidrocarbonetos
<i>Bacillus subtilis</i> HOB2	MEOR, Biorremediação de solos e ambientes marinhos
<i>Brevibacterium aureum</i> MSA13	MEOR
<i>Burkholderia plantari</i> DSM 9509	Detergentes e indústria farmacêutica
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Aplicações ambientais
<i>Candida bombicola</i>	Aplicações ambientais
<i>Micrococcus luteus</i> BN56	Biorremediação de petróleo
<i>Calyptogenia soyoae</i>	Biorremediação de ambientes marinhos

Fonte: MAKKAR, R; CAMEOTRA, S; BANAT, I., 2011, p. 2.

2.2.1 Biorremediação

A biorremediação baseia-se na aceleração dos processos de biodegradação natural em ambientes contaminados. Normalmente consiste na aplicação de fertilizantes contendo fósforo e nitrogênio, ajuste de pH, conteúdo de água e muitas vezes são adicionadas bactérias (MULLER, 1992; VIDALI, 2001). Além disso, quando o poluente apresenta pouca solubilidade, a adição de emulsificantes e surfatantes aumenta a biodisponibilidade destes contaminantes acelerando a velocidade de degradação. O uso extensivo de hidrocarbonetos tem ocasionado um amplo dano ambiental; muitos contaminantes mais persistentes possuem baixa solubilidade em água ou encontram-se fortemente aderidos no solo, conferindo baixa disponibilidade para sua degradação (CALVO et al., 2009). O uso de BS pode melhorar a eficiência da biorremediação destes poluentes hidrofóbicos através da mobilização, solubilização ou emulsificação. A mobilização ocorre em concentrações abaixo da CMC do BS, diminuindo a tensão superficial e interfacial entre ar/água e solo/óleo, reduzindo as forças de capilaridade que unem o sistema solo/óleo. Acima da CMC ocorre a formação de micelas as quais aumentam drasticamente a solubilidade aparente destes compostos hidrofóbicos, criando no interior da micela um ambiente compatível com estas. Este processo de incorporação de moléculas dentro da micela se denomina solubilização. Os BS de alto peso molecular são excelentes agentes emulsificantes e podem ser utilizados para esta finalidade na biorremediação (PACKA-PLOCINICZAK et al, 2011).

As bactérias quando apresentam grande hidrofobicidade podem ligar-se diretamente as gotas de óleo (FRANZETTI, 2010). Foi observado que o BS pode dispersar hexadecano dentro de micro-gotas as quais estão cobertas pelo BS aumentando a biodisponibilidade do contaminante. O processo total consiste em uma combinação da absorção por contato direto e pseudosolubilização do HC em microgotas, os quais são facilitados pelo BS e ocorrem concomitantemente (CAMEOTRA; SINGH, 2009).

Os biossurfatantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Como exemplo, 30% de 2-metilnaftaleno foi efetivamente solubilizado por 10g.L⁻¹ de soforolípideo, além disso, o

soforolípídeo apresentou alta porcentagem de biodegradação de compostos hidrocarbonados como 2-metilnaftaleno, hexadecano e pristano em solos contaminados artificialmente (KANG, 2010). Um aumento importante na solubilidade de hidrocarbonetos do petróleo ocorreu pela adição de ramnolípídeos ou surfactina, em concentrações maiores que a CMC; também demonstraram grande capacidade para incrementar a biodisponibilidade de estes compostos (WHANG et al., 2008).

Na biorremediação podem ser utilizados diretamente os micro-organismos capazes de produzir BS ou alternativamente podem ser adicionados fatores de crescimento para estimular os micro-organismos selvagens presentes no solo ou águas capazes de produzir BS.

A bactéria *Brevibacillus sp.* PMD-3 foi capaz de produzir BS na presença de fenantreno aumentando a solubilidade do hidrocarboneto e permitindo sua degradação, indicando uma associação entre biodegradação de HC e a produção de BS (NAYAK; VIJAYKUMAR; KAREGOUDAR, 2009; REDDY et al., 2010).

Devido à alta eficiência e estabilidade no meio de cultura, os BS podem ser aplicados diretamente nos solos contaminados após a remoção das células. Este procedimento diminui os custos de produção, dado que não se requer purificação, extração ou caracterização do BS (PACKA-PLOCINICZAK et al, 2011).

Diferentemente dos poluentes orgânicos, os metais não podem ser facilmente degradados. A presença destes metais no solo exerce um alto impacto na comunidade microbiana, ocasionando danos à saúde humana, além de contaminar as águas subterrâneas (KIM; VIPULANANDAN, 2006). A remoção de metais dos solos contaminados usando BS têm certas vantagens sobre os surfatantes químicos. Os BS possuem uma ampla diversidade química de maneira que podem ser escolhidos por sua alta especificidade para diversos metais, aumentando a eficiência da remoção, são não tóxicos e altamente biodegradáveis (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2002). Uma solução de 0,1% de di-ramnolípídeos foi testada para avaliar seu potencial como agentes de lavagem de solos contaminados com vários metais, sendo que o BS favoreceu a mobilização dos metais na seguinte ordem $Cd = Cr > Pb = Cu > Ni$ (JUWARKAR et al., 2008). O ramnolípídeos removem metais pesados como Ni e Cd de solos, devido a suas características iônicas, mostrando eficiência entre 80-100% para ensaios de laboratório e 20-80% em solos contaminados (NEILSON; ARTIOLA; MAIER, 2003). De acordo com a literatura, o ácido glutâmico da surfactina pode se

ligar a metais como Mn, Mg, Ca, Ba, Li e Rb (THIMON et al., 1992) e a lavagem de solos com 0.25% desse surfatante remove 70% de Cu e 22% de Zn (MULLIGAN et al., 1999).

2.2.2 Recuperação terciária do petróleo (MEOR)

O processo de melhoramento na recuperação de petróleo é uma tecnologia *in-situ* de recuperação terciária que usa micro-organismos produtores de BS em seus metabolitos para reduzir a tensão das interfaces entre petróleo, rocha e água. Esse processo diminui as forças de capilaridade que evitam que o petróleo flua através dos poros da rocha e permite maior recuperação do petróleo residual (ARMSTRONG; WILDENSCHILD, 2012; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

O processo consiste normalmente em fomentar o crescimento microbiano e a produção de BS inoculando os micro-organismos por injeção direta nos depósitos de petróleo e adicionando nutrientes inorgânicos e fontes de carbono de baixo custo (BANAT, 1995). Os micro-organismos devem ser extremófilos para que possam suportar condições como baixo conteúdo de oxigênio, altas temperaturas, pressões e concentrações de sais (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999). *Bacillus* B24, *Pseudomonas* P15, *Bacillus* PT12, *Pseudomonas aeruginosa* SP24, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus ruber* são exemplos de bactérias que apresentam potencial para recuperação terciária do petróleo (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

2.2.3 Limpeza de reservatórios de lodos de óleos

Os lodos de óleo são gerados em grandes quantidades durante os processos de armazenamento, refino e transporte de óleo. Eles são formados por água, areia, gordura, compostos orgânicos e metais (LIMA et al., 2011b). O óleo é comumente depositado em tanques de estocagens e as impurezas do petróleo se depositam no fundo dos tanques. Durante a limpeza dos tanques o lodo é recuperado e tratado como resíduo. Estes lodos também são gerados durante o tratamento das águas residuais das plantas petroleiras, os quais são depositados em compartimentos especiais que evitam a filtração dos contaminantes (BHATTACHARYYA; SHEKDAR, 2003). No entanto a manutenção e construção destas instalações são onerosas e com o tempo precisam de maiores espaços, implicando em um sério problema ambiental dado que

podem gerar contaminação de águas subterrâneas. Além disso, os lodos conservam energia e seu descarte representa perdas econômicas. Na Índia, as plantas de refinaria produzem aproximadamente 28,000 toneladas de lodos por ano, que podem conter até 70% de hidrocarbonetos (BHATTACHARYYA; SHEKDAR, 2003, KURIAKOSE; MANJOORAN, 1994). Por todas estas razões é necessário diminuir o conteúdo de óleo nos resíduos antes de seu descarte. Uma limpeza periódica deve ser feita nos tanques de estocagem e devido à natureza dos resíduos no fundo do tanque, a remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, as quais são custosas, perigosas e demoradas (BANAT et al., 1991). O pré-tratamento de fundo dos tanques consiste em usar BS que permitem a formação de emulsões que reduzem a viscosidade dos hidrocarbonetos e facilitam sua extração depois da quebra das emulsões (REKHA; DEKA, 2013).

2.2.4 Biossurfatantes na agricultura

Fatores microbianos tais como mobilidade, habilidade para formar biofilmes na superfície da raiz e liberação de moléculas para a comunicação entre células, são necessários para estabelecer associação com as plantas (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). Os BS afetam a mobilidade dos micro-organismos, participam na sinalização e diferenciação, na formação de biofilmes e aumentam a disponibilidades de nutrientes orgânicos, permitindo um crescimento benéfico das plantas (RON; ROSENBERG, 2011; BERTI et al., 2007; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006; KEARNS; LOSICK, 2003). Os BS aumentam a biodegradação de poluentes o qual melhora a qualidade dos solos, fomentando o crescimento indireto das plantas, já que estes possuem propriedades antimicrobianas e também favorecem a interação com micro-organismos benéficos ao crescimento das plantas. Os BS podem ampliar a degradação de alguns pesticidas químicos os quais tendem a acumular-se nos solos (ZHANG et al., 2011a; SINGH et al., 2009; SHARMA et al., 2009). A surfactina e o BS produzido pela *Burkholderia* são potenciais agentes para a biorremediação de diferentes pesticidas, particularmente os glicolipídeos degradam hidrocarbonetos clorados (AWASHTI et al., 1999; MATA-SANDOVAL et al., 2001; WATTANAPHON et al., 2008). Os surfatantes são usados na formulação de pesticidas e herbicidas como

fase orgânica para dissolver os compostos com atividade praguicida. No entanto, estes tensoativos se acumulam no solo afetando a textura, a cor e o crescimento das plantas. Desse modo, considerando esses efeitos adversos e a grande quantidade de pesticidas que são usados a nível mundial, há necessidade de substituir estes compostos por substâncias menos tóxicas como os BS (BLACKWELL, 2000; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

2.2.5 Aplicações terapêuticas

A aplicação de BS na indústria farmacêutica está crescendo devido a sua atividade antimicrobiana, baixa citotoxicidade e habilidade para induzir apoptoses nas células cancerígenas (BURGOS et al., 2013a). As moléculas orgânicas em fase aquosa tendem a imobilizar-se na interface sólida, formando um filme condicionante que afeta as propriedades da superfície original. De igual forma, os BS possuem a capacidade para formar filmes, os quais podem alterar as propriedades de adesão dos micro-organismos (NEU, 1996). Outra propriedade importante que permite o uso de BS em aplicações farmacêuticas é sua habilidade para interagir com membranas gerando a quebra celular devido a um incremento na permeabilidade. Isto ocorre devido a alterações físicas na membrana, ou pela perda da conformação das proteínas, alterando funções tais como transporte e geração de energia, o que concede atividade antimicrobiana a estes compostos (SANCHEZ et al., 2010; ZARAGOZA et al., 2009). Diferentes BS possuem atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos, algas e vírus e esta ampla variedade de atuação é ocasionada pela grande diversidade estrutural dos BS. Os lipopeptídeos como surfactina, iturina, bacilomicina, fengicina, micosubtilina e polimixina B se destacam pela ampla atividade antimicrobiana (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; LANDMAN et al., 2008; VATER et al., 2002).

Os BS também apresentam atividade anticancerígena, ação moduladora da resposta imune, podem ser usados como estimulantes do metabolismo dos fibroblastos da pele, como agentes anti-adesivo em instrumentos cirúrgicos, anticoagulantes, contra o vírus da imunodeficiência humana, etc. (GHARAEI, 2011). Um novo BS produzido por *Sphingobacterium detergens* demonstrou atividade hemolítica e efeitos anti-proliferativos em diversas linhagens celulares, além de

mostrar potencial para aplicações cosméticas e em formulações farmacêuticas (BURGOS et al, 2013b). BS produzidos por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, inibiram a formação de biofilmes de micro-organismos patogênicos sobre poliestireno (BANAT et al. 2010).

2.2.6 Indústria de alimentos

Os BS favorecem a formação e estabilização de emulsões, ajudam na melhoria das características organolépticas dos alimentos e também aumentam sua vida de prateleira. Os BS podem ser usados para controlar a aglomeração de gorduras, estabilizar sistemas areados, melhorar as propriedades reológicas de massas, e melhorar a textura e consistência dos produtos com altos conteúdos de gordura (MUTHUSAMY et al., 2008). Os BS são importantes na indústria da panificação, já que favorecem a manipulação da massa, aumentando sua capacidade de retenção de água e estabilidade. Além disso, durante o processo de fermentação, esses BS aumentam a habilidade de retenção de gás e permitem a emulsificação das gorduras, melhorando, portanto, a qualidade do pão (MNIF et al., 2013). A adição de ramnolipídeos promoveu melhoria nas propriedades do pão como a estabilidade da massa, o volume e o tempo de conservação (MUTHUSAMY, et al, 2008).

Os biofilmes bacterianos na indústria de alimentos são uma fonte potencial de contaminação, podem diminuir a vida útil dos alimentos e transmitir doenças. Portanto, deve-se controlar a adesão destes micro-organismos por meio da limpeza da superfície de contato dos alimentos (NITSCHKE; COSTA, 2005b). Além de propriedades emulsificantes, os BS apresentam propriedades antimicrobianas e anti-adesivas, as quais são usadas no controle da aderência dos micro-organismos nas superfícies de contatos dos alimentos garantindo maior segurança ao produto. BS produzidos pela bactéria termófila *Streptococcus pasteurizers* retardaram a colonização de outras linhagens de *Streptococcus* responsáveis pela diminuição na vida útil dos produtos lácteos (BUSSCHER; VAN DER KUIJ-BOOIJ; VAN DER MEI, 1996). BS produzido por *Lactobacillus plantarum* CFR 2194 mostrou atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar tais como *Escherichia coli* ATCC 31705, *Escherichia coli* MTCC 108, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*

MTCC 859 e *Staphylococcus* sp. f 722. Este BS também apresentou atividade anti-adesiva contra patógenos de origem alimentar (MADHU, A. N.; PRAPULLA, 2014).

2.2.7 Outras aplicações

Os BS podem ser usados para estabilizar microbolhas e estas estruturas, por sua vez, podem ser usadas em processos tecnológicos que envolvem imagens moleculares, sistemas de liberação de medicamentos e genes, detecção precoces de doenças, purificação de água e tratamentos de águas residuais (XU et al., 2011).

Devido a sua compatibilidade com a pele e suas propriedades emulsificantes, de-emulsificantes, capacidade de ligar água e formar espuma, os BS podem substituir os surfatantes sintéticos usados na produção de cosméticos e de higiene como produtos para bebês, *shampoos*, maquiagem, repelentes de insetos, preservativos lubrificados, desodorantes, creme dental, etc. (GHARAEI, 2011).

2.3 Produção

A qualidade, quantidade e o tipo de BS obtido no processo biotecnológico dependem das condições de cultura tais como pH, temperatura e agitação. O rendimento do BS varia com a composição nutricional, concentração, natureza dos metais (íons Mg, P, Fe), fonte de nitrogênio e carbono no meio (AL-ARAJI et al., 2007).

Os BS são produzidos por diversos micro-organismos, geralmente durante seu crescimento em substratos imiscíveis em água. A fonte de carbono determina a estrutura, as propriedades e a quantidade de BS sintetizado (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Os substratos usualmente utilizados para a produção de BS podem ser divididos em três tipos: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais.

A Frutose, a sacarose e o glicerol tem sido reportados como fontes eficientes de carbono na produção de surfactina (KIM et al., 1997; ZHU et al., 2013). Diferente de outros BS, a produção de surfactina não é estimulada por hexadecano (SANDRIN; PEYPOUX ; MICHEL, 1990). *Bacillus subtilis* também pode utilizar lactose como fonte de carbono, uma vez que possui β -galactosidase (CAGRI-MEHMETOGLU; KUSAKLI; VAN DE VENTER, 2012).

Algumas espécies de *Pseudomonas* têm a capacidade de usar substratos lipofílicos e hidrofílicos, como glicerol, manitol, frutose, glicose, parafina e óleos vegetais, para produzir ramnolipídeos (DESAI; BANAT, 1997). O crescimento e produção de BS por *Pseudomonas* spp. demonstrou que o tamanho da cadeia carbonada dos substratos não influenciou o comprimento da cadeia dos ácidos graxos dos glicolipídeos. Ao contrário, o número de carbonos presentes no BS de *Acinetobacter*, varia de acordo ao número de átomos de carbono presente no substrato disponível (alcano). Quando *Dietzia* sp. DQ12-45 foi cultivada em n-alcenos com cadeias de diferentes comprimentos foram gerados diferentes glicolipídeos, fosfolipídeos e lipopeptídeos. Os BS apresentaram ácidos graxos com comprimentos de cadeias (C12-24) mais longas com substratos maiores (DESAI; BANAT, 1997; EDMONDS; COONEY, 1969; WANG et al., 2013).

Alguns estudos sugerem dois tipos de substratos com polaridade opostas no meio de cultura para a melhoria da produção de BS. A produção de soforolipídeos por *Candida bombicola* aumentou significativamente quando o meio de produção contendo uma fonte de carbono hidrofílica foi suplementada com uma fonte de carbono hidrofóbica. Não é frequente usar duas fontes diferentes de carbono no mesmo processo. No entanto, para obter BS de *Sphingobacterium detergens* foi necessária a combinação de glicose e n-alcenos (C11-13), já que os alcenos são usados pela célula como um indutor da produção de BS em um processo co-metabólico (BURGOS et al., 2013b; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

O nitrogênio é importante na produção de BS porque é um elemento essencial das proteínas, que permite o crescimento microbiano e a produção de enzimas necessárias ao metabolismo. A produção de BS frequentemente ocorre quando a fonte de nitrogênio esgota-se no meio durante a fase estacionária (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Geralmente a produção de muitos metabolitos secundários de *Bacillus* é induzida quando um ou mais nutrientes essenciais são esgotados. Em contraste, a produção de surfactina é induzida durante o crescimento celular até a fase pós-exponencial (VATER, 1986).

As fontes de nitrogênio usadas para a geração de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* são geralmente sais de nitrato, amônia e uréia. Dentre estes, o mais eficiente é o NaNO_3 , pois o nitrato é assimilado lentamente, devido a sua redução dissimilatória de nitrato para amônio e posterior assimilação pelo

metabolismo glutamina-glutamato (SANTA-ANNA et al., 2002). A relação C/N entre 15-23 foi definida como a uma faixa ótima para obter uma boa produtividade de ramnolipídeos, usando glicose e óleos vegetais como fontes de carbono (ARINO; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1996; SINGH; TRIPATHI, 2013b). Quando NaNO₃ foi incorporado ao meio de cultura, foi observada que a fermentação com *Pseudomonas aeruginosa* apresentava uma relação entre consumo de substrato, crescimento e produção de BS, cuja máxima produção de BS foi obtida a uma concentração de 7% (v/v) de melaço (PATEL; DESAI, 1997). Uma alta produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas* pode ser gerada pela inibição do glutamato sintetase por amônio, metionina, asparagina e glutamina usados como fontes de nitrogênio (VENKATA; KARANTH, 1998).

O peptídeo ComX e CSF acumulam-se e estimulam a transcrição do operon *srf*, dando lugar a produção de surfactina através de sinais extracelulares (COSBY, 1998). *Bacillus subtilis* tem facilidade para usar o glicerol para a síntese destes peptídeos que estimulam a produção de surfactina (ZHU et al, 2013). Para seu crescimento e produção de BS, linhagens de *Bacillus subtilis* apresentam diferentes preferências por nitrogênio orgânico ou inorgânico. Observou-se que *Bacillus subtilis* DM-03 utilizou nitrato de amônio para produzir lipopeptídeo, já *Bacillus subtilis* DM-04 requer suplementação com triptona (DAS; MUKHERJEE, 2007).

Pseudomonas fluorescens podem usar amônio e nitratos como fontes de nitrogênio, no entanto para obter grandes concentrações de BS deve-se limitar as quantidades deste nutriente. Um aumento da produtividade foi também observada em proporção C/N 10 (ABOUSEOUDA et al., 2008). *Pseudomonas aeruginosa* também demonstrou maior síntese de BS quando foram usadas condições de nitrogênio limitadas. Estas limitações não somente aumentaram a produção de BS, como também modificaram a composição das moléculas (RAMANA; KARANTH, 1989).

A síntese da porção peptídica dos lipopeptídeos ocorre por via extra-ribossomal através de sistema multi-enzimático. O uso de aminoácidos como fonte de nitrogênio pode influenciar o tipo e a quantidade de lipopeptídeo gerado. A presença de L-isoleucina ou L-valina como única fonte de nitrogênio no meio de cultura aumenta a produção de val⁷-surfactina, enquanto que a quantidade deste lipopeptídeo apresentou uma acentuada redução quando o aminoácido usado foi L-leucina (DESAI; BANAT, 1997; PEYPOUX; MICHEL, 1992). A adição de ácido glutâmico e asparagina

aumentou a produção de liquenesina-A por *Bacillus licheniformis* BAS50 (YAKIMOV et al., 1995).

A concentração dos íons na produção de BS é importante, uma vez que são usados como cofatores de muitas enzimas. O Fe^{2+} e Mn^{2+} aumentam a produção de surfactina (COOPER et al., 1981; THIMON; PEYPOUX; MICHEL, 1992). A limitação nas concentrações de Mn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ permite melhorar o rendimento na produção de ramnolipídeos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 (NITSCHKE et al., 2005a).

As condições de cultivo como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio também exercem efeitos importantes na produção do BS. *Bacillus subtilis* BBK1 apresentou um pH ótimo entre 6,5 e 7,0 em meio contendo 40 g.L⁻¹ glicose, 4,5 g.L⁻¹ NH_4NO_3 , 40 mg.L⁻¹ MnSO_4 e 6 mM.L⁻¹ FeSO_4 , com uma produção entre 2,25-3 g.L⁻¹ (ABUSHADY et al., 2005). Quando *Nocardia amarae* cresceu em óleo de oliva, observou-se rendimento maior na produção de BS quando a cultura foi agitada a 150 rpm (TAREK; GABER; SHEREEN, 2006).

2.4 Biossurfatantes produzidos pelo gênero *Bacillus*

Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por sua capacidade de produzir lipopeptídeos cíclicos, que podem ser divididos em dois grupos (HE et al., 2001).

Grupo 1: a região N-terminal da cadeia peptídica está unida através de uma ligação amida com um ácido graxo β -amino ou ácido graxo β -hidroxil e o grupo carbonila da região C-terminal forma uma lactona com grupos β -hidroxil, como por exemplo surfactina e lichenisinas ou formam um anel lactâmico com o grupo β -amino, como iturinas e bacilomicinas. Nestes casos o ácido graxo é incorporado dentro do sistema cíclico (figura 5) (PEYPOUX et al., 1981; YAKIMOV, 1995).

Grupo 2: representado por plipastatinas, colistinas e octapeptinas, onde a região N-terminal do peptídeo cíclico está unida por uma ligação amida ao ácido graxo, permanecendo fora do sistema cíclico (figura 5) (HE et al., 2001).

Figura 5- Representação esquemática da posição do ácido graxo (vermelho) em (a) iturina; (b) colistina

Fonte: ISOGAI et al., 1982, p. 3067; NAGHMOUCHI et al., 2012, p. 367.

A bactéria *Bacillus subtilis* é um organismo Gram-positivo (figura 6), em forma de bastonete, formador de endósporos e é uns dos membros mais estudados deste gênero. Entre 4-5% de seu genoma é utilizado para a síntese de antibióticos, possuem capacidade de produzir mais de 24 antibióticos com uma ampla variedade estrutural. Os antibióticos peptídicos são os principais desta espécie e exibem uma estrutura cíclica e hidrofóbica altamente rígida, são usualmente resistentes a hidrólise por proteases e são insensíveis a oxidação. São conhecidas centenas de linhagens selvagens de *Bacillus subtilis* (ONGENA; JACQUES, 2008; STEIN, 2005).

Bacillus subtilis e *Bacillus amyloliquefaciens* parecem ser as únicas capazes de sintetizar iturina. A biossíntese de fengicina pode ocorrer por diversas linhagens como *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (ONGENA; JACQUES, 2008).

De acordo com a literatura, *Bacillus licheniformis* TR7 e *Bacillus subtilis* SA9 produzem lipopeptídeos extracelularmente quando cultivadas em melaço (SAIMMAI; SOBHON; MANEERAT, 2011). Foi também reportado que *Bacillus megaterium* produz uma mistura de diferentes lipopeptídeos quando cultivado por 24 horas, a 37°C em um meio mineral (TROYANO et al., 2009).

Figura 6- *Bacillus subtilis* ATCC 21332 após coloração de Gram

2.5 Surfactina

2.5.1 Características da surfactina

A surfactina de *Bacillus subtilis* é um lipopeptídeo cíclico que exibe alta atividade superficial e emulsificante, que contém uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, com um comprimento de cadeia de carbono C_{13} – C_{18} , que diminui a tensão superficial da água de 72,0 para 27,9 $mN.m^{-1}$, em concentrações menores que 0,0005% ($m.m^{-1}$) e a tensão interfacial água-hexadecano de 43,0 para valores $< 1 mN.m^{-1}$ (ARIMA et al., 1968).

A produção de surfactina requer os produtos do operon *srf*, codificados por três subunidades da surfactina-sintetase que catalisam o mecanismo da síntese peptídica não ribossomal para incorporar os 7 amino ácidos dentro do lipopeptídeo (FUMA et al., 1993; GALLI et al., 1994). A produção da surfactina é um processo onde o operon é ativado por um sistema regulatório ligado ao acúmulo de sinais extracelulares gerados pela célula. O objetivo biológico para a regulação da produção de surfactina seria eliminar a competição quando se apresenta escassez de nutrientes e coordenar o nível de produção de agentes antimicrobianos pela população para controlar o impacto dos produtos secretados. A surfactina é produzida por uma comunidade celular com alta densidade de *Bacillus subtilis* visando enviar um agente lipofílico capaz de dispersar agregados hidrofóbicos, deixando-lhes propensos a degradação e assimilação (COSBY et al., 1998).

A massa molar e a composição dos ácidos graxos presentes na porção peptídica tem sido relacionadas a diferentes atividades biológicas (SIVAPATHASEKARAN et al., 2010a; SIVAPATHASEKARAN; MUKHERJEE; SEN, 2010b; SUN et al., 2006). A porção peptídica das surfactinas não foi afetada quando em contato com papaína, tripsina, bromelina e ficina, sendo que os BS continuaram formando emulsões estáveis com diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais, o que demonstra sua estabilidade (KIM et al., 1997; COSTA, 2005).

A atividade e solubilidade da surfactina dependem da organização dos aminoácidos produzindo dois domínios: o domínio hidrofílico menor e o domínio hidrofóbico maior. A mudança dos aminoácidos na posição 2, 4 e 7 da surfactina (XS₂, XS₄ e XS₇ na figura 7) por um resíduo mais hidrofóbico aumenta a atividade superficial e diminui a concentração micelar crítica (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999; SCHNEIDER; STACHELHAUS; MARAHIEL, 1998; STACHELHAUS; SCHNEIDER; MARAHIEL, 1995). Devido ao menor valor da CMC, o uso de uma concentração reduzida de surfactina é suficiente para obter os mesmos efeitos na diminuição da tensão superficial e interfacial que os surfatantes químicos (COOPER et al., 1981; KIM et al., 1997; HAFERBURG et al., 2003).

Figura 7- Estrutura dos membros representativos da família da surfactina sintetizada pelo gênero *Bacillus*

Fonte: ONGENA, M.; JACQUES, P., 2007, p. 118.

Os resíduos de ácido glutâmico e aspártico da surfactina podem ligar-se a metais, tais como, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ e Rb^+ . Os cátions divalentes permitem uma ligação através de pontes salinas entre duas ou mais moléculas de surfactina, por isso apresentam potencial para serem usados na dessorção de metais contaminantes de solos (THIMON et al, 1992). A surfactina também pode ser usada no processo de recuperação melhorada do petróleo (MEOR), devido à redução de viscosidade e tensão interfacial óleo/rocha. A surfactina apresenta ainda propriedades antimicrobianas frente a bactérias e fungos fitopatogênicos, além de ação anti-inflamatória, antitumoral e antitrombótica. (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

2.5.2 Produção de surfactina

Os fatores nutricionais, fatores tensão de oxigênio, agitação, remoção de espuma, modo de operação do processo e modificação genética podem melhorar o rendimento da produção de surfactina (SHALIGRAM, SIGNHAL, 2010).

O rendimento da produção da surfactina pode ser melhorado pela remoção do BS pelo fracionamento de espuma e pela adição de sais de ferro e manganês (COOPER et al., 1981). O fracionamento de espuma aumenta a transferência de oxigênio a fase líquida. Devido a maior facilidade da bactéria para usar os nutrientes, também observou-se uma diminuição do tempo de produção de surfactina (NOAH; BRUHN; BALA, 2005; NOAH et al., 2001).

A fermentação em estado sólido implica no crescimento dos micro-organismos em substratos sólidos úmidos e apresenta certas vantagens sobre a fermentação tradicional submersa, como baixos custos de produção, menor consumo de água e energia, menor problema com resíduos e estabilidade do produto devido a menor diluição no meio (ZHU et al., 2010). O cultivo de *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em biorreator de coluna com aeração forçada produziu $3,3 \text{ g.kg-SS}^{-1}$ (sólido seco) de surfactina (TREVISAN, 2012).

A linhagem *Bacillus subtilis* ATCC 21332 pode também produzir fengicina, especialmente quando as células são imobilizadas. CHTIOUI et al. (2010) demonstraram a produção de surfactina e fengicina com célula imobilizadas *B. subtilis*

ATCC 21332, sendo que após 48 horas o biofilme produziu de 2-4 vezes mais surfactina e 15 vezes mais fengicina que as células planctônicas.

A surfactina apresenta boa estabilidade quando submetidas a diversas condições, sendo úteis em processos industriais. Por exemplo, a surfactina produzida por *B. subtilis* LB5a apresentou estabilidade a elevadas temperaturas, alto conteúdo de sais (20% NaCl) e ampla faixa de pH (NITSCHKE, 2004b; NITSCHKE; PASTORE, 2006).

Entre os métodos usados para a purificação da surfactina pode-se citar a extração com diclorometano como uma etapa inicial para eliminar as impurezas da surfactina bruta e posteriormente pode-se fazer uma recristalização que permita a eliminação das impurezas polares. Para atingir graus mais altos de purificação, geralmente são empregados métodos de cromatografia, tais como, a cromatografia de absorção com coluna de sílica gel ou HPLC como a cromatografia por exclusão de tamanho ou fase reversa (DE FARIA et al., 2010; HORNEMAN et al., 2004; NITSCHKE; PASTORE, 2006; WEI, LAI, CHANG, 2007).

Como uma caracterização preliminar de lipopeptídeos pode-se fazer uma identificação da presença de aminoácidos (revelador ninhidrina) e lipídeos (vapor de iodo) através de cromatografia de camada delgada (Kiran et al., 2010b). A presença da cadeia alifática e os componentes peptídicos podem ser identificados por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI) permite observar o íon molecular e a partir da espectrometria de massa em tandem (MS/MS) é possível obter a sequência dos aminoácidos. Esta informação junto com as análises de RMN ^1H e ^{13}C permitem a elucidação da estrutura da surfactina (DE FARIA et al., 2011).

2.6 Substratos lignocelulósicos

A lignocelulose é o principal e mais abundante componente da biomassa produzida pela fotossíntese e um dos recursos biológicos renováveis mais abundantes na natureza (RAGAUSKAS et al., 2006). A lignocelulose é formada por celulose, hemicelulose e lignina e geralmente a composição química da biomassa lignocelulósica, contém 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de

lignina (SANTOS et al., 2012). Vários métodos têm sido desenvolvidos para melhorar a hidrólise da lignocelulose, como pré-tratamentos físico-químicos e biológicos, cujo principal objetivo é remover a lignina, hidrolisar a hemicelulose em açúcares fermentáveis, e reduzir a cristalinidade da celulose favorecendo a liberação da glicose (CUERVO; FOLCH; QUIROZ, 2009).

A celulose é um polímero de D-glucose com ligações glicosídicas β -1,4 que se estruturam em longas cadeias lineares unidas por ligações de hidrogênio e forças intramoleculares de van der Waals, formando uma estrutura cristalina resistente a hidrólises e regiões amorfas propensas a degradação enzimática (CUERVO; FOLCH; QUIROZ, 2009). A hemicelulose é um polímero complexo de heteropolissacarídeos, que incluem D-xilose, L-arabinose, D-glucose, D-manose e D-galactose. Os açúcares estão unidos por ligações β -1,4 e a estrutura apresenta ramificações (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). A lignina é um heteropolímero amorfo, tridimensional e ramificado formado por fenilpropanos com hidrogênios substituídos por grupos metanos (VANHOLME et al., 2010).

Comparadas com a celulose, as hemiceluloses têm maior suscetibilidade à hidrólise ácida. Devido ao seu caráter amorfo elas permitem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais geralmente usados como catalisadores. Na hidrólise enzimática da lignocelulose, a lignina pode capturar irreversivelmente as enzimas, determinando a quantidade de enzima requerida e sendo muito difícil a recuperação desta (LACERDA, 2012).

O material lignocelulósico é a maior fonte de carbono renovável conhecida e a maior parte deste material é queimada liberando uma grande quantidade de CO₂ ao ambiente (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Os resíduos lignocelulósicos da indústria agrícola podem ser usados para processos biotecnológicos como a produção de etanol e ácidos graxos, os quais tem se mostrado promissores. Um dos problemas enfrentados é a baixa capacidade da maioria dos micro-organismos de interesse em usar açúcares C5 para seu crescimento (HENKEL et al., 2012). Além disso, para poder ser utilizado em processos de fermentação, o material lignocelulósico deve ser submetido a processos mecânicos e químicos visando a extração dos açúcares simples. Durante os pré-tratamentos são gerados alguns subprodutos que inibem o crescimento das bactérias e que devem ser removidos do substrato. Entre eles

destacam-se os furfurais, hidroximetilfurfurais, ácido levulínico e ácido fórmico (HENKEL et al., 2012; LACERDA, 2012). As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem degradar esses compostos. Assim, a produção de ramnolipídeos utilizando hidrolisados celulósicos não tratados seria uma alternativa viável (HENKEL et al., 2012; LARSSON et al., 2009; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

A torta de girassol e a torta de semente de colza (FG e FSC) são subprodutos da extração de óleos, e a geração delas é estimada em 35 e 14,9 milhões de toneladas, respectivamente¹. Estes resíduos são compostos principalmente de proteínas, fibras lignocelulósicas e minerais e, portanto, representam uma boa fonte alternativa de nitrogênio e carbono (LOMASCOLO et al., 2012). Usando FSC através de uma fermentação em estado sólido com *Bacillus subtilis* foi obtida iturina A com rendimento de 5,3 g.kg⁻¹ em peso de cultura seca após 90 horas (YAO et al., 2012).

A palha do arroz representa 50% do peso seco da planta e é um resíduo agrícola abundante que gera uma produção anual de 100 milhões de toneladas a nível mundial. Devido ao seu alto potencial como fonte de biomassa lignocelulósica, pode ser usada em processos biotecnológicos e dessa maneira diminuir o impacto ambiental gerado pela queima deste subproduto (QUINCENO; MOSQUERA, 2010). A palha do arroz foi usada como substrato para a produção de surfactina em fermentação em estado sólido através de *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173, a produção ótima de surfactina foi obtida em meio contendo 5 g de farinha de soja, 4 g de palha de arroz, 2% (p.p⁻¹) de maltose e 2,65% (p.p⁻¹) de glicerol (ZHEN et al., 2013). A produção atingiu 15,03 mg.g⁻¹ de substrato, sendo o custo do processo estimado em US\$ 0,001 por mg de surfactina. O custo da surfactina pura está em torno de US\$ 30 por mg (Sigma Chemical Co. Ltd.) (ZHEN et al., 2013).

Lactobacillus acidophilus converteu glicose em biomassa, ácido láctico e BS, usando como meio de fermentação o hidrolisado de resíduos da vinicultura (vine-shoot trimming). Os açúcares hemicelulósicos deste resíduo são uma interessante alternativa para tornar competitivos os custos de produção dos BS, tendo em vista a grande quantidade gerada a nível mundial (PORTILLA et al., 2008).

¹ <http://www.indexmundi.com/agriculture/>

Distilled grape marc (DGM) é outro abundante resíduo de vinicultura, obtido depois do esmagamento das uvas para a elaboração de vinho, o qual é constituído por material lignocelulósico e ácidos orgânicos que podem ser usados para a produção de ácido láctico e BS. O licor clarificado da hidrólise de *distilled grape marc* foi usado como meio de fermentação para a produção de BS por *Lactobacillus pentosus*. A concentração máxima de BS foi 5,9 g.L⁻¹ apresentando CMC de 2,9 g.L⁻¹, além disso, os biossurfatantes obtidos foram capazes de emulsificar 60 e 40% de gasolina e querosene, respetivamente (PORTILLA et al., 2007).

Bacillus pumilus UFPEDA 448 foi usado no processo de fermentação em estado sólido para a produção de surfactina usando diversos subprodutos agrícolas, sendo que a mistura na proporção de 50% (p.p⁻¹) de bagaço de cana de açúcar e okara apresentam as melhores condições para a produção do BS. A surfactina apresentou CMC 12,2 g.L⁻¹ e atividade emulsificante superior a 50% para diversos hidrocarbonetos e óleos vegetais (TREVISAN, 2012).

O hidrolisado de turfa foi utilizado para produzir surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, sendo que a bactéria utilizou todos os açúcares resultantes da hidrólise ácida, com preferência pela glicose, arabinose e manose durante as primeiras 18 horas; e a atividade da surfactina foi semelhante àquela obtida com meio convencional. Os autores evidenciaram que a composição nutricional determina as propriedades de superfície do BS e o rendimento do processo (SHEPPARD; MULLIGAN, 1987).

2.6.1 Sisal

O sisal (*Agave sisalana*) é uma planta de elevada complexidade morfofisiológica, sendo uma monocotiledônea, apresenta sistema radicular fibroso e em forma de tufo, possui dois tipos de raízes designadas por transportadoras e alimentadoras, sendo as primeiras responsáveis pela fixação da planta ao solo (figura 8). É uma espécie que prefere locais de altitude e possui elevada resistência à seca e ao estresse térmico, apresentando eficiência transpiratória e gastando muita pouca água para produzir fitomassa (menos de 100g de água por grama, contra quase dez vezes mais no caso do algodão herbáceo). Necessita de precipitação pluvial de pelo menos 400 mm/ano

e temperaturas médias entre 20 a 28°C. Prefere solos com elevados teores de cálcio, que não encharquem facilmente e que tenham boa fertilidade natural (SINDIFIBRAS, 2012).

O sisal é originário da península de Yucatã no México, é uma das variedades mais destacadas comercialmente, a expansão de sisal do seu centro de domesticação, ocorreu rapidamente após a conquista deste território pelos espanhóis, onde os nativos carregavam plantas de Agave com o objetivo de preparar uma bebida fermentada proveniente do suco das suas folhas chamada “pulque”, o qual foi preponderante para a dispersão do sisal na região norte do continente. A dispersão do gênero *Agave* em outros continentes se deu por intermédio de espanhóis e portugueses, que o introduziram como planta ornamental. Além disso, o sisal é a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo (SINDIFIBRAS, 2012).

Figura 8- A imagem da direita é a planta de sisal e a imagem da esquerda é a polpa celulósica moída usada neste estudo

Fonte: <http://www.corbisimages.com/Search#p=4&q=Sisal>

A produção global de sisal em 2008 foi de 247,800 toneladas, os países com maior produção foram Brasil, China, Tanzânia e Quênia (FAO, 2009). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de fibra e manufaturados de sisal, com 58% de produção e 70% da exportação, gerando uma produção anual de cerca de 140,000

toneladas, atingindo principalmente o mercado europeu e asiático (EMBRAPA, 2012; SINDIFIBRAS 2012). A cultura do sisal está concentrada em 112 municípios do Nordeste, sendo os estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte os principais produtores, entre estes a Bahia o maior produtor com mais de 95% da produção nacional. A cultura é de fundamental importância na economia nordestina porque torna produtiva regiões semi-áridas, sem alternativas econômicas e baixo índice de desenvolvimento humano (IDH). A indústria do sisal produz 800,000 empregos diretos e indiretos, que mantém unidos os homens desta região, sendo uma das poucas opções de cultivo com viabilidade econômica para a região semi-árida do Nordeste do Brasil (EMBRAPA, 2012, SINDIFIBRAS, 2012).

Segundo dados de Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a produção brasileira de fibra seca de sisal foi, no ano 2004, de 139,700 toneladas, representando o percentual de apenas 4% da folha; por sua vez, os resíduos sólidos do desfibramento obtidos para este quantitativo de fibra, que correspondem a 14% da folha, foram de ordem de 489,000 toneladas, quantidade bastante significativa e que deve ser estudada para um aproveitamento melhor. No desfibramento, apenas 4% da folha do sisal é aproveitada na forma de fibra, o outro 96% forma os resíduos do beneficiamento, 16 % são resíduos sólidos e 80 % são resíduos líquidos. Esses resíduos se constituem de suco ou seiva vegetal, partículas de tecidos parenquimatosos e de pedaços de folhas e fibras de diferentes tamanhos (SINDIFIBRAS, 2012). No Brasil, esses resíduos são também chamados bagaço e, na maioria das vezes, abandonados no campo, nos últimos anos, através de pesquisas, vem surgindo algumas alternativas de aplicabilidade tanto para a fibra quanto para seus resíduos, que são utilizados como adubo orgânico. O líquido do sisal pode ser usado como bioinseticida e bioherbicida em culturas de milho e algodão e na alimentação de ruminantes. A fibra de sisal industrializada tem diversas aplicações como compostos plásticos usados em veículos, fabricação de cordas, barbantes, cabos marítimos, tapetes, sacos, vassouras, briquetes, artesanato. Também é usada na fabricação de diferentes tipos de papéis como papel Kraft, papel higiênico, filtro, etc (MARTIN et al., 2009).

Apesar da importância da cultura de sisal para região nordeste, nos últimos anos ocorreu um decréscimo da produção e da área plantada como consequência de uma crise para a qual contribuem vários fatores. Além do alto custo de produção podem-

se citar como principais, entre as causas técnicas, o uso de tecnologias inadequadas no desfibramento e beneficiamento com grandes desperdícios e não aproveitamento dos resíduos (SINDIFIBRAS, 2012).

A celulose de sisal pode ser usada como reforço de matrizes biodegradáveis, biocompósitos de celulose/quitosana, etc. (LACERDA, 2012; MORAN, 2008). A despolimerização de celulose de sisal pode ocorrer via hidrólise ácida ou enzimática, e os açúcares gerados durante a hidrólise podem ser usados para a produção de etanol (LACERDA, 2012) ou outros produtos biotecnológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Verificar o potencial de uso do licor de hidrólise ácida e enzimática da polpa de sisal como substratos para produzir surfactina através de *Bacillus subtilis* ATCC 21332

3.2 Específicos

- Caracterizar as propriedades físico-químicas (TS, TI e CMC) dos tensoativos obtidos
- Isolar e quantificar o BS sintetizado
- Determinar o potencial dos BS sintetizados para biorremediação

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Bacillus subtilis ATCC 21332 produtor de surfactina (COOPER et al., 1981).

4.2 Meios de cultura

Para manutenção das bactérias foram utilizadas placas (figura 9) contendo ágar nutriente (NA). As culturas foram conservadas em geladeira (5°C) e repicadas a cada 30 dias. Para a produção de surfactina foram utilizados o meio basal de Cooper modificado e o licor proveniente da hidrólise da polpa celulósica de sisal.

Figura 9- Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em ágar nutriente

4.2.1 Meio basal

Meio basal (g.L⁻¹): glicose 40, NH₄NO₃ 4,0, KH₂PO₄ 4,08, Na₂HPO₄ 5,67, FeSO₄.7H₂O 0,015, MgSO₄.7H₂O 0,197, MnSO₄.7H₂O 0,002, CaCl₂.2H₂O. A glicose foi esterilizada separadamente (SHEPPARD; COOPER, 1991). pH final 6,8 – 6,9.

4.2.2 Meios alternativos

A polpa celulósica utilizada neste trabalho foi obtida a partir da fibra lignocelulósica de sisal, que possui entre 7-10% de lignina (PAIVA; FROLLINI, 2006), e foi gentilmente cedida pela empresa Lwarcell (Lençóis Paulista, SP), onde foi desenvolvido o processo de polpação (ou deslignificação) do tipo kraft e sequência de branqueamento do tipo ECF (Elemental Chlorine Free).

Os hidrolisados ácido e enzimático de sisal (figura 10) foram preparados pelo Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas do IQSC-USP de acordo com a metodologia descrita por LACERDA (2012), cujo objetivo foi estudar a obtenção de nanofibras celulósicas a partir deste processo. O licor residual resultante dos processos de hidrólise ácida e enzimática foram então testados quanto a sua potencialidade como fonte de carbono para a produção de surfactina.

Figura 10- Aspecto do licor resultante da hidrólise enzimática (direita) e ácida (esquerda)

4.2.2.1 Hidrólise ácida

Uma amostra de 90 g de celulose foi submetida a hidrólise ácida usando 1800 mL de H_2SO_4 4,6 mol.L⁻¹, sendo a reação conduzida a 100°C durante 6 horas.

4.2.2.2 Hidrólise enzimática

A celulose foi adicionada em tampão citrato 0,01 mol.L⁻¹ na proporção de 0,5 mL para cada grama de celulose, a mistura foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. Logo após os frascos foram colocados em incubadora sob agitação orbital a 50°C por cerca de 2 horas para estabilização da temperatura. Logo a seguir, foram adicionados 0,5 mL de Accellerase® 1500 para cada grama de celulose deixando-se reagir por 6 horas.

Accellerase® 1500 é um complexo enzimático composto principalmente por exoglucanases, endoglucanases, hemi-celulases e β -glicosidases (LACERDA, 2012) e foi cedida pela empresa Genencor.

4.2.2.3 Armazenamento

O licor resultante da hidrólise foi armazenado até o momento do uso. O hidrolisado enzimático foi mantido a -20°C em garrafas plásticas e o hidrolisado ácido foi preservado a 8°C em garrafas de vidro.

4.2.2.4 Preparação dos substratos

O licor proveniente da hidrólise ácida foi neutralizado com KOH 17M e filtrado, enquanto a hidrolisado enzimático foi descongelado, filtrado e seu pH ajustado para 7,0.

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado através do método DNS. O hidrolisado enzimático apresentou um conteúdo de açúcares redutores de $10,65 \text{ g.L}^{-1}$ e o hidrolisado ácido de $9,96 \text{ g.L}^{-1}$, portanto o meio basal foi ajustado de acordo com este teor médio de açúcares redutores (glicose) para fins comparativos.

Os substratos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

A concentração dos constituintes do meio (meio basal) foi ajustada de acordo com a concentração de açúcares redutores presentes no licor. Após a esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos foram adicionados com a fonte de carbono em capela de esterilização, ou seja o licor foi adicionado ao meio em substituição a glicose. A concentração dos açúcares redutores às 48 horas foi $2,88 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,66 \text{ g.L}^{-1}$ para o meio contendo hidrolisado ácido e hidrolisado enzimático, respectivamente. Sendo a fonte de carbono o fator limitante do crescimento e para garantir a produção de surfactina, foi adicionado ao meio de cultura uma quantidade de açúcares redutores (hidrolisado) correspondente a concentração inicial da fonte de carbono.

4.3 Preparo do inóculo e condições de cultivo

A cultura de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 preservada a -20°C foi semeada em uma placa contendo ágar nutriente e incubada em estufa a 30°C por 24 horas; uma alça da cultura foi transferida para tubo de ensaio com 8 mL de caldo nutriente incubando-se em agitador tipo shaker a 150 rpm por 24 horas a 30°C. Posteriormente 1 mL da suspensão bacteriana foi padronizada ajustando-se a DO (610nm) para 0,52 e posteriormente transferida para frascos erlenmeyer de 150 mL contendo 20 mL de caldo nutriente, os quais foram incubados em agitador shaker a 150 rpm por 9 horas a 30°C. Uma alíquota de 1 mL do inóculo bacteriano foi transferida para erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de meio cuja fonte de carbono era glicose, hidrolisado ácido ou enzimático. A cultura foi incubada em agitador tipo shaker a 150 rpm por 72 horas a 30°C. Após o cultivo, o meio foi submetido a centrifugação 8,000g por 20 minutos para a separação das células e foram realizadas medidas do conteúdo de açúcares redutores (DNS), tensão superficial e diluição micelar crítica (CMD), também foi determinado pH e crescimento bacteriano (contagem número de células viáveis).

4.4 Determinação de crescimento bacteriano e atividade tensoativa

4.4.1 Determinação do número de células viáveis

O número de células viáveis foi determinado por diluições sucessivas e contagem em placa usando o método da gota (MILES; MISRA, 1938). Uma alíquota de 1 mL de amostra foi retirada do meio de cultivo, diluída em 9 mL de água destilada estéril e agitada vigorosamente em vortex. Esta primeira diluição foi sucessivamente diluída (figura 11), posteriormente alíquotas de 20 µL de cada diluição foram colocadas na superfície de placa contendo ágar nutriente. Após incubação em estufa a 30°C, o número de colônias presentes em cada gota foi contado e expresso em UFC/mL (figura 12). Todos os ensaios foram realizados em triplicata como forma de minimizar os erros analíticos.

Figura 11- Representação esquemática da diluição sucessiva para contagem do número de células viáveis

Figura 12- Contagem de células viáveis de *Bacillus subtilis* em ágar nutriente

4.4.2 Determinação da Tensão Superficial

As medidas da tensão superficial foram realizadas em tensiômetro Attension modelo Sigma 700/701 utilizando o método do anel de Du Nöuy, a 25°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.3 Determinação da Diluição Micelar Crítica (CMD)

Alíquotas de 1 mL dos meios de cultura isento de células foram diluídos 10 vezes (CMD⁻¹) e 100 vezes (CMD⁻²) em água destilada, e a tensão superficial das respectivas diluições foram determinadas medidas utilizando o método do anel de Du Nöuy. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5 Determinação de açúcares

Os ensaios para açúcar redutor total, carboidratos totais e glicose foram realizados em triplicata.

4.5.1 Determinação de açúcar redutor total

Os açúcares redutores foram determinados usando o método DNS (MILLER, 1959).

4.5.2 Determinação de carboidratos totais

Foi usado o método fenol-sulfúrico (DANIELS et al., 1994).

4.5.3 Determinação de glicose

Utilizou-se kit comercial enzimático para a determinação de glicose sanguínea (GOD/POD) da marca Wiener Lab. Os ensaios foram conduzidos de acordo com orientação do fabricante.

4.5.4 Cromatografia Líquida de Alta eficiência (HPLC)

Utilizou-se cromatógrafo líquido da marca Shimadzu equipado com: Bomba (modelo LC-10AD); Controlador de Sistema (modelo SCL-10A); Detector de Índice de Refração Diferencial (modelo RID 6A); Detector Espectrofotométrico UV-Visível (modelo SPD-10AV); Forno para coluna (modelo CTO-10A); Processador de dados - Cromatopac (modelo C-R7AE) e Injetor de amostras / 20µL – Rheodyne (modelo 7125). Os dados foram tratados no software CLASS-LC10.

Os seguintes padrões foram usados para análise: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido glicurônico, ácido fórmico, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Todas as medidas foram feitas em duplicata.

4.5.4.1 Determinação de açúcares

Para cada grupo de compostos analisados foram utilizadas condições de análise diferentes:

Celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido glicurônico, ácido fórmico, ácido acético foram analisadas utilizando-se:

- Detector: Índice de Refração – RID-6A.
- Coluna: Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm BIO-RAD).
- Eluente: H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹.
- Fluxo: 0,6 mL.min⁻¹.
- Temperatura: 45°C (MARABEZI, 2009; PASQUINI, 2005).

4.5.4.2 Determinação de furfural e HMF

Furfural e HMF foram analisados utilizando-se:

- Detector: UV – 274 nm, modelo SPD-10AV.
- Coluna: μ BondapakTM C₁₈ (Waters).
- Eluente: solução de acetonitrila / água 1:8 (v.v⁻¹), contendo ácido acético 1% (v.v⁻¹).
- Fluxo: 0,8 mL.min⁻¹.
- Temperatura: ambiente (MARABEZI, 2009; PASQUINI, 2005).

4.6 Extração e semi-purificação do biossurfatante produzido

4.6.1 Concentração de biossurfatante bruto

A surfactina bruta foi isolada através de precipitação ácida (HEYD et al., 2008). Uma alíquota do meio de cultura livre de células foi adicionada de HCl 6N até pH 2,0 e mantida por 12 horas a 4°C. O precipitado foi coletado após centrifugação a 8,000g por 20 minutos e recuperado com água destilada (pH 2,0), sendo colocado em vidro relógio e levado para estufa a 60°C por 12 horas e dessecador, até peso constante.

4.6.2 Semi-purificação da surfactina sintetizada

A surfactina bruta foi submetida a recristalização: o produto extraído foi dissolvido em água destilada, ajustado o pH 7,0 com NaOH, filtrado e posteriormente o pH foi reajustado para 2,0 e esta solução foi centrifugada a 8,000g por 20 minutos obtendo-se um sólido amarelo que foi levado para estufa a 60°C por 12 horas e dessecador, até peso constante (CAGRI-MEHMETOGLU; KUSAKLI; DE VENTER, 2012). Os biossurfatantes semi-purificados obtidos foram utilizados para os testes de caracterização e aplicação bem como para análise estrutural.

4.7 Caracterização do BS quanto às propriedades físicas e composição química

4.7.1 Determinação da Tensão Interfacial

Foi determinada contra hexadecano utilizando o método do anel Du Nöuy em tensiômetro Attension modelo Sigma 700/701.

4.7.2 Concentração Micelar Crítica (CMC)

As medidas da concentração micelar crítica foram realizadas em tensiômetro Attension modelo Sigma 700/701 utilizando o software Attension sigma.

Para o hidrolisado enzimático a determinação da CMC foi realizada automaticamente medindo-se a tensão superficial de diferentes diluições de uma solução 0,1% (p.v⁻¹) da surfactina semi-purificada. O cálculo do valor da CMC foi realizado utilizando-se o Software Attension Sigma 700.

Devido ao baixo rendimento da surfactina obtida em hidrolisado ácido e seu maior grau de impurezas, as diluições para a determinação da CMC foram feitas manualmente com o dispensador Schott Titronic Universal 20 mL. Preparou-se 10 mL de uma solução de BS semi-purificado 0,45% (p.v⁻¹) diluindo-se sucessivamente com água destilada. As diluições foram feitas até que o valor de tensão se aproximasse ao

valor da água. A CMC foi calculada através do gráfico da tensão superficial x concentração do BS (COOPER et al., 1987).

4.7.3 Espectrometria de massa

As amostras foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo quadrupolo/tempo de voo, modelo Microtof-QII (Bruker Daltonics). As amostras foram ionizadas por “electrospray” operando no modo positivo, ou seja, todas as espécies presentes no espectro (íon molecular e fragmentos) são formas protonadas.

As amostras de surfactina padrão (Sigma) e biossurfatantes foram dissolvidas em mistura de acetonitrila/água (1:1 v.v⁻¹) + 0,01% de ácido fórmico e injetadas no aparelho (NITSCHKE, 2004b).

4.8 Aplicações

4.8.1 Potencial para biorremediação

A capacidade de remoção de diesel de areia contaminada foi avaliada pelo método de lavagem de areia baseado na metodologia descrita por URUM; PEKDEMIR; COPUR (2004a). Amostras de 10 g de areia foram adicionadas de 1 g de óleo diesel (Shell), deixando-se em contato por 3 dias em temperatura ambiente. Alíquotas de 5 g da areia contaminada foram transferidas para frascos erlenmeyer de 125 mL, adicionados de 20 mL das soluções de BS obtidos em hidrolisado ácido e enzimático na concentração de 0,15 e 0,10 % (p.v⁻¹) respectivamente e levados para agitador shaker por 24 horas a 150 rpm e 30 °C. Retirou-se o líquido da primeira lavagem procedendo-se a uma segunda adição de 20 mL das soluções de BS (a segunda lavagem foi feita nas mesmas condições que a primeira). O líquido da segunda lavagem foi removido e a amostra de areia foi colocada em estufa a 50°C por 12 horas. O diesel residual presente na areia foi extraído com 2 lavagens usando 10 mL de diclorometano por vez, este líquido foi colocado em estufa a 30°C por 12 horas e mantida em dessecador até peso constante. A massa de diesel foi aferida pela diferença. Esta massa corresponde ao diesel não extraída pelo BS (M₁). Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Para conhecer a massa inicial do diesel na areia (M_0), alíquotas de 5 g da areia contaminada foram transferidas para frascos erlenmeyer de 125 mL, adicionados de 10 mL de diclorometano, se deixo lavar por 20 minutos em agitador shaker a 150 rpm e 30 °C. Retirou-se o líquido da primeira lavagem e repetiu-se o processo uma vez mais, os líquidos das lavagens foram reunido em baker previamente tarado, colocado em estufa a 30°C por 12 horas e mantida em dessecador até peso constante. A massa de diesel foi aferida pela diferença. A porcentagem de remoção de diesel pela surfactina foi determinada da seguinte maneira:

Porcentagem de diesel não removido pelo BS (R_1)

M_1 = diesel não extraído pelo BS

$\%RBS = (\text{massa areia com diesel} - M_1) / \text{massa areia com diesel} \times 100$

Porcentagem de massa de diesel não extraída pelo BS (R_1)

$R_1 = 100 - \%RBS$

Porcentagem de diesel não removido pelo diclorometano (R_2)

$\%RDCM$ = Porcentagem de remoção pelo diclorometano

M_0 = massa inicial do diesel na areia

$\%RDCM = (\text{massa areia com diesel} - M_0) / \text{massa areia com diesel} \times 100$

Porcentagem de massa de diesel não extraída pelo DCM (R_2)

$R_2 = 100 - \%RDCM$

Porcentagem de remoção de diesel por biossurfatante (R_3)

$R_3 = R_2 - R_1 / R_2 \times 100$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise comparativa da cinética de produção de BS nos três meios propostos

5.1.1 Crescimento bacteriano

As curvas de crescimento bacteriano nos meios contendo celulose de sisal e no meio sintético são apresentadas na figura 13. Os estudos revelaram que os meios propostos são capazes de suplementar os nutrientes necessários para o crescimento de *Bacillus subtilis*. Nos meios contendo glicose e hidrolisado enzimático o crescimento bacteriano atinge a fase estacionária depois de 12 horas de cultivo. Pelo contrário, no meio contendo hidrolisado ácido observa-se queda acentuada no número de células viáveis durante as primeiras 12 horas; o hidrolisado ácido foi submetido a condições extremas de acidificação, altas temperaturas e posterior neutralização. Provavelmente, a bactéria passou por uma fase de adaptação ao substrato devido a presença de substâncias tóxicas ou sais formados durante as etapas de hidrólise e neutralização. A presença de furfurais e hidroximetilfurfurais (HMF) foram detectadas em concentrações de 0,00695 g.L⁻¹ e 0,00235 g.L⁻¹ respectivamente (figura 14), e podem ter influenciado o crescimento das bactérias mesmo nestas pequenas concentrações. Os furfurais e HMF são formados durante a sacarificação através de reações de desidratação de pentoses e hexoses respectivamente, e uma fração destes compostos podem ser degradados a ácidos orgânicos (figura 15) (ALMEIDA et al., 2009). Dado que os furaldeídos são mutagênicos, a divisão celular em sua presença induz danos celulares inibindo a glicólise e as enzimas glicolíticas ou também podem reagir com constituintes celulares, o que gera uma redução no crescimento. Os micro-organismos minimizam os efeitos dos furaldeídos através da conversão química destas espécies em compostos menos inibitórios principalmente álcoois (ASK et al., 2013). Protegem e têm a capacidade de reparar alguns danos celulares, mais estes processos só tem lugar quando as concentrações iniciais destas espécies não são altas (ALMEIDA et al.; 2009). Uma velocidade alta de conversão de furaldeídos é um fator preponderante para alcançar uma alta velocidade de fermentação (MODIG et al., 2008).

Os sais formados durante a neutralização (K_2SO_4), também podem ter interferido no crescimento da bactéria. *Bacillus subtilis* é conhecido por crescer em meios contendo até 16% (p/v) de sal. Algumas moléculas estão relacionadas ao alto grau de resistência osmótica do *Bacillus subtilis*, entre elas a prolina que se acumula intracelularmente em altas concentrações sem ocasionar danos ao funcionamento celular. A prolina atua estabilizando a estrutura quaternária das proteínas, protegendo a integridade dos componentes celulares e interações proteína-ADN. A glicina-betaína, também ajuda a proteger a célula de estresse ocasionado por alta osmolaridade (KAPPES; KEMPF; BREMER, 1996; ROONGSAWANG et al., 2002). Entre 24-36 horas a bactéria apresentou um crescimento significativo da população no meio contendo hidrolisado ácido, entrando posteriormente na fase estacionária (tabela 3 e figura 13).

Uma possível explicação para a redução da população observada inicialmente poderia ser a formação de endósporos. Quando *Bacillus subtilis* enfrenta a carência de nutrientes essenciais pode adotar diferentes respostas tais como mobilidade, secreção de enzimas extracelulares, competição por transformação genética, produção de antibióticos e finalmente esporulação (CARVALHO et al., 2010). A esporulação é geralmente a última estratégia usada para a sobrevivência sendo os endósporos formados capazes de tolerar diversos fatores ambientais tais como calor, radiação UV e agentes químicos nocivos. Além de oferecer um alto nível de proteção os endósporos têm a capacidade de germinar gerando nova célula vegetativa quando em condições favoráveis (AMITEYE et al., 2003).

Em meio contendo glicose pode se observar que depois da etapa de crescimento (figura 13), a população tende a reduzir, uma explicação poderia ser a formação de subprodutos tais como ácido acético que atuam como inibidores diminuindo a cinética e limitando a produtividade (BLENCKE et al., 2003; WEI; CHU, 1998).

Em geral, o meio contendo hidrolisado enzimático de celulose de sisal permitiu crescimento bacteriano mais rápido mostrando maior número de células viáveis em comparação com o hidrolisado ácido e o meio contendo glicose, portanto oferece um ambiente mais favorável para o crescimento e produção de BS.

Tabela 3- Comparação do crescimento celular de *Bacillus subtilis* em meio contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático.

Tempo (horas)	Hidrolisado enzimático (log UFC/mL)	Hidrolisado ácido (log UFC/mL)	Glicose (log UFC/mL)
0	7,27	7,09	7,20
11	8,62	3,50	8,24
24	8,74	5,20	7,69
35	8,89	7,73	6,91
48	8,96	8,31	6,72
59	8,91	8,57	6,11
72	8,95	8,39	5,96

Figura 13- Crescimento de *Bacillus subtilis* em meio contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático como fontes de carbono

Figura 14- Espectro HPLC do meio de hidrolisado ácido que evidencia a presença de furfural

Figura 15- Representação esquemática da formação e transformação de furfural e HMF

Fonte: ALMEIDA et al., 2009, p. 626.

5.1.2 pH e Diluição micelar crítica

Durante o processo foi evidenciado um aumento de pH (básico) nos meios propostos, no entanto quando a fonte de carbono usada foi glicose a tendência foi uma diminuição do pH (ácido) (figura 16). Os valores de CMD^{-1} e CMD^{-2} (tabela 4) obtidos com o hidrolisado enzimático foram menores que aqueles obtidos em glicose e hidrolisado ácido (figuras 17 e 18), sugerindo que houve maior produção de agente tensoativo neste meio, uma vez que a CMD fornece uma indicação indireta da concentração de surfatante, ou seja, quanto menor o valor de CMD, maior é a diluição necessária para causar uma mudança significativa na tensão superficial (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). Os valores de CMD^{-1} e CMD^{-2} para o hidrolisado ácido, em geral, apresentam valores próximos a TS da água, indicando uma baixa produção de BS, em contraste a glicose proporcionou valores mais baixos de CMD^{-1} , verificando-se maior quantidade de BS em 72 horas. Os valores mais altos de CMD para a glicose foram obtidos entre 12-24 horas, simultaneamente o pH caiu abaixo de 5 (tabela 4). A literatura relata que a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 usando o meio sintético de Cooper e NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio promoveu queda de pH, pois durante o crescimento de *B. subtilis* em glicose sem limitação de oxigênio, é produzido ácido acético em resposta a um incremento no ácido pirúvico o qual não é usado completamente no ciclo de Krebs. Esta diminuição de pH abaixo de 5 pode provocar uma precipitação da surfactina diminuindo o BS dissolvido no meio. Uma solução para evitar este problema é o controle de pH durante o processo (BLENCKE et al., 2003; PHALAKORNKULE et al., 2000; WEI; CHU, 1998). Os valores de CMD no meio contendo hidrolisado enzimático permaneceram constantes sugerindo que a produção de surfactina atingiu um valor limitante (DAS; MUKHERJEE, 2007). Em glicose, após 35 horas o valor de CMD reduziu porém em 48 horas apresentou aumento no valor de TS (figura 17 e tabela 4), uma possível explicação poderia ser a degradação enzimática da molécula em resposta a exaustão de determinado nutriente essencial do meio estimulando a bactéria a utilizar o biosurfatante como substrato (NITSCHKE, 2004b).

Tabela 4- Comparação de tensão superficial (TS), diluição micelar crítica (CMD) e pH para o processo de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* nos diferentes substratos propostos

Tempo (horas)	Glicose			pH
	TS (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻² (mN.m ⁻¹)	
0	56,52	59,89	67,52	6,89
11	35,16	53,81	69,09	4,54
24	30,51	47,31	70,43	4,71
35	29,62	31,50	52,38	5,37
48	29,80	34,30	63,45	5,18
59	31,44	46,87	71,39	5,50
72	30,20	32,80	41,20	6,40

Tempo (horas)	Hidrolisado Enzimático			pH
	TS (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻² (mN.m ⁻¹)	
0	47,66	55,67	67,00	6,73
11	27,33	30,18	39,60	6,86
24	27,58	29,28	39,21	8,32
35	28,17	30,50	39,64	8,82
48	28,76	32,53	41,91	7,89
59	28,49	33,20	42,10	7,75
72	28,42	33,10	42,06	8,13

Tempo (horas)	Hidrolisado Ácido			pH
	TS (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	CMD ⁻² (mN.m ⁻¹)	
0	46,08	64,03	70,12	6,67
11	42,82	55,31	64,17	6,64
24	29,30	59,33	62,00	6,63
35	27,07	50,48	66,37	7,42
48	27,00	45,53	57,21	7,37
59	27,36	60,58	67,26	7,91
72	27,19	45,42	68,37	8,12

Figura 16- Variação do pH do meio de cultura contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático

Figura 17- Valores de CMD⁻¹ do meio de cultura contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático

Figura 18- Valores de CMD^{-2} do meio de cultura contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático

5.1.3 Concentração micelar crítica

O valor de CMC demonstra diretamente a eficiência de um surfatante, ou seja, o CMC é uma útil ferramenta para a seleção de surfatantes para aplicações específicas. A tensão superficial e interfacial de um sistema que contém um surfatante puro não varia quando sua concentração está acima de seu valor de CMC, dado que a maioria das moléculas encontra-se formando micelas, em outras palavras, um excesso de micelas não afeta a atividade superficial ou interfacial (LEÃO, 2011).

O valor de CMC para o produto obtido a partir da fermentação do hidrolisado enzimático de sisal (figura 19) foi 64 mg.L^{-1} e a tensão interfacial contra hexadecano de $3,8 \text{ mN.m}^{-1}$ (tabela 5). Para o hidrolisado ácido (figura 20) os valores obtidos foram 1394 mg.L^{-1} e $5,7 \text{ mN.m}^{-1}$, respectivamente. Em outros estudos com *Bacillus subtilis* usando como fonte de carbono a glicose foram relatados valores de CMC de $17,88$ e 23 mg.L^{-1} (GIRO et al., 2009; SHEPPARD; MULLIGAN, 1987). Estes valores são menores que a CMC da surfactina obtido no hidrolisado enzimático, porem as diferenças podem se dever a composição dos meios, as condições de cultura, a

linhagem empregada e ao grau de purificação (BARROS; PONEZI; PATORE, 2008). A CMC da surfactina obtida neste trabalho é comparável com a CMC de Triton N-101, Tween 20 e Tween 80, os quais estão na faixa entre 63-157 mg.L⁻¹ e é muito inferior comparado com valores de CMC para surfatantes sintético como Tergitol TMN-10, dodecil sulfato sódico (SDS) e Citrikleen cujos valores estão entre 1200-2000 mg.L⁻¹ (BRAMWELL; LAHA, 2000; DOONG; LEI, 2003; GUHA; JAFFÉ, 1996). Deste modo, pode considerar-se que o substrato apresenta bom potencial para uso em processos industriais visando a produção de surfactina.

Tabela 5- Comparação de tensão superficial (TS), interfacial (TI) e CMC para surfactina produzida em hidrolisado ácido e enzimático

BS	TS mN.m ⁻¹	TI mN.m ⁻¹	CMC mg.L ⁻¹
H. enzimático	28,71	3,81	64
H. ácido	29,79	5,70	1394

O valor de CMC para o hidrolisado ácido aproximou-se ao do SDS ou seja, 1600 mg.L⁻¹ (BRAMWELL; LAHA, 2000). O alto valor da CMC foi ocasionado pela presença de muitas impurezas que não foram eliminadas pelo método de purificação proposto, estou fiz necessário o uso de uma quantidade maior de amostra para alcançar o valor da CMC. Este dado corrobora com os valores de CMD que indicam a baixa produção de BS (tabela 4). Em contraste, o BS obtido no hidrolise enzimático depois da cristalização apresento baixo conteúdo de impurezas, as quais podem causar redução na CMC, este fenômeno é ocasionado por uma competição pela superfície que se estabelece entre as primeiras micelas e as impurezas, gerando retardo na estabilização da tensão superficial e erro na determinação da CMC (MOLINA, 1994).

O BS obtido no hidrolisado enzimático foi muito mais eficiente em relação ao obtido no hidrolisado ácido, concluindo-se que a composição e natureza do meio foi o fator determinante para as propriedades e o rendimento dos BS sintetizados (SHEPPARD, MULLIGAN, 1987).

a)

b)

Figura 19- Determinação da CMC para a surfactina obtida em a) meio contendo hidrolisado enzimático, através do método do anel de Du Nöuy; b) meio contendo hidrolisado ácido, através de diluições sucessivas do meio de cultura

5.1.4 Determinação e uso de açúcares

O pré-tratamento realizado na polpa celulósica de sisal com solução alcalina (mercerização), leva a uma alteração nos teores de hemicelulose (DE PAULA et al., 2012). A eficiência do tratamento depende das condições utilizadas (concentração da solução, temperatura e tempo de tratamento), portanto, pode permanecer pequena quantidade de hemiceluloses na polpa. Este tratamento e as reações de hidrólise foram realizadas pelo Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas do Instituto de Química de São Carlos na Universidade de São Paulo. A polpa celulósica obtida apresentou um teor de 97,5% de celulose e 2,5% de hemicelulose. Por este motivo, após realizadas as reações de hidrólise ácida ou enzimática na polpa celulósica, podem estar presentes açúcares como D-xilose, L-arabinose, D-manose e D-galactose, provenientes da hidrólise da hemicelulose, que também pode levar a formação de ácido acético. Estes compostos podem ser detectados utilizando-se cromatografia de alta eficiência (HPLC) (LACERDA, 2012).

As cadeias de celulose são formadas por monômeros de β -glicose unidos entre si por ligações β -1,4-glicosídicas. A fórmula empírica da celulose é $(C_6H_{10}O_5)_n$, com n variando de 5000-10000 unidades, por isso o peso molecular da cadeia é variável (NEVELL; ZERONIAN, 1985; MOHAN; PITTMAN; STEELE, 2006).

As reações de hidrólise levam a quebra das ligações glicosídicas, diminuindo, assim, o tamanho das cadeias celulósicas. Estas cadeias apresentam vários tamanhos. O licor, proveniente das hidrólises, contém glicose, celobiose, açúcares provenientes da hemicelulose e derivados, como hidroximetilfurfural e furfural. Pode conter, ainda, cadeias solúveis de maiores tamanhos. A figura 21 apresenta a polpa celulósica antes da hidrólise e o licor obtido depois da hidrólise.

Figura 20- Polpa celulósica antes da hidrólise (esquerda); licor da hidrólise ácida e enzimática (direita)

A análise da composição de açúcares presentes nos meios contendo hidrolisado ácido e enzimático foram realizadas por HPLC. Detectou-se a presença de glicose e pequena concentração de xilose (figura 22). A análise dos açúcares presentes também foi realizada por metodologia para açúcares redutores, carboidratos totais e glicose (enzimática), porém devido a composição do hidrolisado ácido não foi possível uma determinação adequada do conteúdo de glicose e carboidratos totais neste meio através dos métodos usados.

O hidrolisado enzimático apresentava concentração dos carboidratos totais correspondente aos açúcares redutores (tabela 6), e a pequena diferença entre os açúcares redutores totais e glicose é equivalente ao conteúdo de xilose detectado. Como pode-se observar o *B. subtilis* foi capaz de utilizar a xilose durante a etapa de crescimento, comportamento que também foi relatado em estudos anteriores (SHEPPARD, MULLIGAN, 1987). Este fato pode representar uma vantagem, uma vez que este açúcar é um dos maiores componentes da hemicelulose e muitos micro-organismos usados em biotecnologia não possuem a maquinaria metabólica para usar açúcares C5 (HENKEL et al, 2012).

Figura 21- Cromatograma de determinação de açúcares do meio contendo hidrolisado enzimático de celulose de sisal

Tabela 6- Concentração de carboidratos totais, açúcares redutores, glicose e xilose no meio contendo hidrolisado enzimático de sisal

TEMPO (horas)	CARBOIDRATO TOTAL (g.L ⁻¹)	AÇÚCARES REDUTORES (g.L ⁻¹)	GLICOSE (g.L ⁻¹)	XILOSE (g.L ⁻¹)
0	12,43	12,53	12,07	0,46
11	7,01	6,95	6,81	0,14
24	1,09	0,94	*	-
35	0,80	0,74	*	-
48	5,98	5,92	5,59	0,33
59	5,77	5,59	5,39	0,20
72	5,31	5,27	5,20	0,07

*Quantidades não detectável por este método.

Quando em presença de diferentes fontes de carbono, as bactérias utilizam preferencialmente aquela que podem metabolizar mais rapidamente. Para a maioria das bactérias, entre elas o *Bacillus subtilis*, a fonte de carbono preferencial é a glicose. Na presença de glicose a expressão de genes que codificam para utilização de outras fontes de carbono são fortemente reprimidas. Este fenômeno é conhecido como repressão catabólica (FISHER; SONENSHEIN, 1991).

O gênero *Bacillus* é capaz de degradar diferentes polissacarídeos que se encontram em grandes quantidades na biomassa vegetal. Os oligo, di e monossacarídeos são transportados ao interior da célula e posteriormente catabolizados. *Bacillus subtilis* pode usar aproximadamente 18 mono ou

dissacarídeos como única fonte de carbono. Uma vez captados são fosforilados e subseqüentemente metabolizado pela via glicolítica ou pentoses-fosfato (STÜLKE; HILLEN, 2000). Geralmente, enzimas catabólicas de outras vias são sintetizadas somente quando seu substrato está presente no meio e a fonte de energia mais favorável não se encontra presente. Os genes e operons que codificam para as enzimas requeridas nestes processos são usualmente expressos apenas quando o respectivo substrato está presente. A transcrição de diferentes operons catabólicos em *Bacillus subtilis* estão sob controle negativo por repressores específicos, o operon *Xyl* codifica as enzimas requeridas para o catabolismo de xilose. A regulação do uso da xilose é negativamente controlada pelo repressor *XylR*. Quando a xilose está ausente o repressor *XylR* liga-se aos operadores impedindo a expressão da sequência de genes do operon. Quando a xilose está presente *XylR* é liberado dos operadores o que permite a transcrição do operon *XylAB* (STÜLKE; HILLEN, 2000). O uso da xilose resulta em menor produção de energia na forma de ATP quando comparada com a glicose (ASK et al., 2013).

5.1.5 Cinética de produção dos biossurfatantes

Nos meios de glicose e hidrolisado ácido, após 48 h foram consumidos ao redor de 70% (2,98 e 2,88 g.L⁻¹, respectivamente) dos açúcares, enquanto que no hidrolisado enzimático 95% (0,66 g.L⁻¹). Portanto após este período, sendo a fonte de carbono exaurida e sabendo-se que é fator limitante para o crescimento bacteriano, adicionou-se novamente fonte de carbono as culturas perfazendo a quantidade de açúcares redutores do início do processo visando garantir o crescimento bacteriano e a produção do BS.

A tensão superficial do sobrenadante do meio é uma indicação geral do progresso e não está diretamente relacionada à quantidade de BS. A tensão superficial do meio formulado com hidrolisado enzimático reduziu de 47,66 para 27,33 mN.m⁻¹ após 11 horas (figura 23), o qual representa uma queda de TS de 43%, este decréscimo foi acompanhado por consumo de 47% dos açúcares (tabela 7) e um aumento no crescimento bacteriano (figura 23). Posteriormente observou-se que a tensão superficial permaneceu estável em redor de 28 mN.m⁻¹ até as 72 horas. As 35

horas 92% dos açúcares foram consumidos limitando a fonte de carbono, contudo pode-se observar que a produção de BS não foi afetada, pois a TS e CMD permaneceram constantes (figura 23).

No meio contendo hidrolisado ácido a TS reduziu de 46,08 para 29,30 mN.m⁻¹ em 24 horas (figura 24), o que representa uma redução de 36% na TS com um consumo de açúcar de 55%. Posteriormente, observou-se que a TS permaneceu em torno de 28,00 mN.m⁻¹, como consequência, se pode dizer que o micro-organismo (*Bacillus subtilis*) apresenta capacidade de produzir BS no meio proposto entretanto, os valores de CMD (figura 24) revelam que a quantidade de surfactina produzida foi muito baixa.

No meio de cultura contendo glicose a TS diminuiu de 56,21 para 30,51 mN.m⁻¹ após 24 horas, esta queda de 46% na TS foi acompanhada de um consumo de 55% dos açúcares presentes no meio (figura 25). Comparando-se o processo de produção de BS nos três meios conclui-se que a bactéria se adaptou melhor ao hidrolisado enzimático, sendo que após 24 horas 90% dos açúcares foram consumidos, enquanto nos outros meios o consumo foi de aproximadamente 50% (tabela 7 e figura 26).

Tabela 7- Tensão superficial (TS) e consumo de açúcares redutores totais (AR) por *Bacillus subtilis* crescendo em meio contendo glicose, hidrolisado ácido e enzimático

Tempo (horas)	Hidrolisado enzimático		Hidrolisado ácido		Glicose	
	TS (mN.m ⁻¹)	AR (g.L ⁻¹)	TS (mN.m ⁻¹)	AR (g.L ⁻¹)	TS (mN.m ⁻¹)	AR (g.L ⁻¹)
0	47,66	10,65	46,08	9,96	56,52	11,15
11	27,33	5,62	42,82	8,14	35,16	7,39
24	27,58	1,05	29,30	4,44	30,51	5,05
35	28,17	0,81	27,07	3,04	29,62	3,57
48	28,76	6,05	27,00	6,85	29,80	8,65
59	28,49	4,75	27,36	4,32	31,44	7,84
72	28,42	3,95	27,19	3,23	30,20	4,95

a)

b)

Figura 22- Cinética de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* em meio contendo hidrolisado enzimático de celulose de sisal. a) Crescimento celular, consumo de açúcares, pH e TS b) CMD e TS

a)

b)

Figura 23- Cinética de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* cultivada em meio contendo hidrolisado ácido de celulose de sisal. a) Crescimento celular, consumo de açúcares, pH e TS b) CMD e TS

a)

b)

Figura 24- Cinética de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* cultivada em meio contendo glicose. a) Crescimento celular, consumo de açúcares, pH e TS b) CMD e TS

Figura 25- Consumo de açúcares redutores totais por *Bacillus subtilis* nos diferentes meios testados

Para a produção de surfactina em hidrolisado enzimático pode-se observar relação entre crescimento, utilização de substrato e produção de BS (figura 23) (DESAI; BANAT, 1997). O aumento na produção de surfactina pode ser evidenciado com os valores de CMD, apesar de que a partir das 48 horas se observa um incremento nos valores da CMD, este fato pode se dever a adição de hidrolisado enzimático no meio de cultura não significando queda na produção de surfactina; este crescimento também pode inferir-se dos dados de extração de surfactina bruta (tabela 8). A recuperação do biosurfatante produzido também revelou que a maior quantidade de surfactina foi obtida após 72 horas em meio contendo hidrolisado enzimático (0,5459 g.L⁻¹), devido a maior parte de surfactina ser obtida durante a fase estacionária, este BS pode ser considerado um metabolito secundário. Este fato já foi evidenciado em estudos anteriores onde *B. subtilis* ATCC 21332 cultivado em 1% de glicose e 0,4 % (NH₄)₂HPO₄ apresentou a maior produção de surfactina depois das 40 horas, quando a cultura se encontrava na fase estacionária (SHEPPARD, MULLIGAN, 1987). A regulação na biossíntese da surfactina está fortemente relacionada com a fase estacionária quando os nutrientes no meio de cultura são limitados (ABAS et al., 2013; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

O carbono e nitrogênio atuam como substratos limitantes na produção de surfactina. Durante a fermentação de *B. subtilis* ATCC 21332 em 10 g.L⁻¹ de glicose e 4 g.L⁻¹ de NH₄NO₃, a limitação de carbono ocorreu concomitante a fase estacionária e o acúmulo de surfactina. Quando as condições nutricionais foram alteradas para 30 g.L⁻¹ de glicose e 1 g.L⁻¹ de NH₄NO₃, foi observado que o amônio é usado preferentemente sobre o nitrato durante a fase de crescimento e quando este nutriente esgotou-se o nitrato começou a ser usado pela bactéria, notando-se que o início da fase estacionária coincide com a limitação do nitrato e a maior produção de surfactina (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999). Vários estudos relataram que o consumo de amônio favorece o crescimento porém o nitrato é a fonte de nitrogênio que permite obter melhores rendimentos na produção de surfactina (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Também sabe-se que o ferro atua como um estimulador do crescimento e que o manganês é um indutor de endosporos e amplia a produção de surfactina (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

Em meio contendo glicose, também fica evidenciado uma relação entre consumo de açúcares, crescimento bacteriano e produção de surfactina durante as primeiras 12 horas (figura 25) que correspondem com a fase de crescimento exponencial. Os produtos do metabolismo formados durante esta etapa ocasionaram uma diminuição no pH do meio. Observou-se que a acidificação por um excesso de glicose no meio diminui a produção de surfactina, este fenômeno também ocorre devido a adição de ferro (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010; YEH; WEI; CHANG, 2005). O aumento da produção de surfactina (máximo valor de CMD) as 72 horas ocorreu quando o pH aumentou para 6,4. Também pode considerar-se que a surfactina neste processo é um metabolito secundário.

Por outro lado, no meio contendo hidrolisado ácido a maior produção de surfactina se dá depois das 36 horas quando atinge-se a fase estacionária (figura 24) e a fonte de carbono esta esgotando-se, sugerindo produção sob condições limitadas de crescimento caracterizado por um aumento nos níveis de BS como resultado da limitação de um ou mais componentes do meio (DESAI; BANAT, 1997).

Evidenciou-se que quando *B. subtilis* ATCC 21332 foi cultivado em hidrolisado enzimático ocorreu maior consumo dos açúcares e maior quantidade de surfactina foi produzida. Pelo contrário, em glicose e hidrolisado ácido a produção de BS foi menor

sugerindo que estes meios não ofereceram as melhores condições para o processo. Como se pode observar o balanço do conteúdo nutricional é fundamental na determinação da produção de surfactina. As fontes de carbono e nitrogênio são fatores determinantes que afetam marcadamente a produção dos BS (ABAS et al, 2013).

5.2 Extração e rendimento de surfactina

Foi realizada extração de BS a cada 24 horas determinando-se que a maior quantidade de produto foi obtida após 72 horas em ambos os meios, sendo que se obteve maior quantidade de BS bruto a partir da extração do meio de hidrolisado ácido (tabela 8) devido provavelmente à maior quantidade de impurezas presentes.

Tabela 8- Extrato bruto de BS obtida em diversos tempos

Tempo (horas)	BS bruto em hidrolisado enzimático (g.L ⁻¹)	BS bruto em hidrolisado ácido (g.L ⁻¹)
24	0,0882	0,9524
48	0,0968	2,4240
72	0,5459	4,4300

Obteve-se um precipitado amarelo claro (hidrólise enzimática) e outro marrom (hidrólise ácida) que foram obtidos a partir de precipitação ácida (figura 27); a coloração está relacionada com a cor que apresentam os respectivos substratos. O produto foi submetido a uma nova etapa de purificação (recristalização) obtendo-se coloração um pouco mais clara (figura 28), mas a aparência do sólido marrom evidenciava seu alto grau de impurezas presentes. O rendimento da produção de surfactina semi-purificada foi 136 e 96 mg.L⁻¹ nos meios contendo hidrolisado enzimático e ácido, respectivamente. Esta quantidade é baixa comparada com rendimento de até 3340 mg.L⁻¹ de surfactina que pode ser obtido através de *B. subtilis* ATCC 21332 usando glicose como fonte de carbono (WEI, Y-H; LAI; CHANG, 2007).

(a)

(b)

Figura 26- Surfactina bruta obtida em meio de cultura contendo (a) hidrolisado ácido; (b) hidrolisado enzimático de sisal

(a)

(b)

Figura 27- Surfactina semi-purificada obtida em meio de cultura contendo (a) hidrolisado ácido; (b) hidrolisado enzimático de sisal

5.3 Comparação com outros meios lignocelulosicos

Poucos trabalhos relatam a utilização de substratos de natureza celulósica na produção de surfactina (SHEPPARD, MULLIGAN, 1987; SITOHI et al., 2010; ZHU et al., 2013). A surfactina obtida a partir de fermentação submersa com okara (39% de carboidratos) usando *Bacillus subtilis* NRRL-94, apresentou propriedades úteis para biorremediação além de ação antimicrobiana; a CMD^{-1} de 48 mN.m^{-1} relatada (SITOHI et al, 2010) é equiparável com os obtidos em nosso estudo. A palha de arroz foi utilizada como fonte de carbono para a produção de surfactina por fermentação em estado sólido atingindo uma produção de 15,03 mg de surfactina por grama de

substrato (ZHU et al, 2013), rendimento maior se comparada com o obtido neste estudo. A fermentação em estado sólido (FES) oferece diversas vantagens em comparação com a fermentação submersa, como maior estabilidade do produto devido a menor diluição no meio e alta especificidade das reações (ZHU et al, 2013). Em outro trabalho o hidrolisado ácido de turfa foi utilizado como fonte de carbono na produção de surfactina sendo que o produto obtido apresentou CMC de 160 mg.L⁻¹ (SHEPPARD, MULLIGAN, 1987) ou seja, maior do que o obtido na surfactina produzida em hidrolisado enzimático (64 mg.L⁻¹). Em geral, pode dizer-se que as propriedades dos biossurfatantes obtidos neste trabalho são comparáveis aos obtidos nos meios convencionais e em estudos relacionados com substratos lignocelulósicos usando *Bacillus subtilis*.

5.4 Espectrometria de massas

O espectro ESI da surfactina semi-purificada obtida da fermentação em hidrolisado enzimático (figura 29), mostrou que os íons com maior abundância na amostra foram aqueles com relação m/z 1044, 1058, 1036, 1030 e 1022, revelando a possível presença de moléculas protonadas $[M+H]^+$ de m/z 1008, 1022, 1036 e seus adutos de sódio $[M+Na]^+$ de m/z 1030, 1044, 1058 e potássio $[M+K]^+$ de m/z 1046, 1060, 1074 (tabela 9). A intensidade relativa dos íons é uma indicação da composição porcentual de cada molécula nas amostras, a molécula mais abundante foi m/z 1044, a qual corresponde ao aduto de sódio do lipopeptídeo com 14 carbonos na cadeia lipídica (SAVADOGO et al., 2011).

O padrão de surfactina também foi analisado, sendo que o espectro de massas ESI (figura 30) apresentou uma fragmentação muito semelhante ao obtido para surfactina produzida no hidrolisado enzimático, evidenciando-se a presença de dois íons principais $[M+H]^+$ de m/z 1022 e 1036. Estes íons indicam que de fato a surfactina foi o BS sintetizado por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Para o hidrolisado ácido (figura 31) se pode observar a presença dos íons com relação m/z 1022, 1036, 1044 que também indicam a presença da surfactina. A intensidade dos íons moleculares é menor o que confirma a maior impureza desta amostra. Na figura 32 é mostrada a representação esquemáticas dos íons moleculares.

O hidrolisado ácido foi submetido a neutralização com KOH assim era esperado que os adutos deste íon estivessem presentes no produto. Além disso, a presença no meio de cultura do tampão fosfato (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4) pode ter contribuído para a maior predominância destas formas. Destaca-se que a purificação do BS foi parcial e portanto estas impurezas não foram removidas.

Tabela 9- Designação dos principais íons presentes na surfactina

Ion (m/z)	Espécie de surfatante
1008	$\text{C}_{13} [\text{M}+\text{H}]^+$
1022	$\text{C}_{14} [\text{M}+\text{H}]^+$
1036	$\text{C}_{15} [\text{M}+\text{H}]^+$
1030	$\text{C}_{13} [\text{M}+\text{Na}]^+$
1044	$\text{C}_{14} [\text{M}+\text{Na}]^+$
1058	$\text{C}_{15} [\text{M}+\text{Na}]^+$
1046	$\text{C}_{13} [\text{M}+\text{K}]^+$
1060	$\text{C}_{14} [\text{M}+\text{K}]^+$
1074	$\text{C}_{15} [\text{M}+\text{K}]^+$

Figura 28- (a) Espectrometria de massas (ESI) da amostra de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* em hidrolisado enzimático de polpa de sisal; (b) expansão do espectro de massas (ESI) na faixa 1042-1065 m/z

Figura 29- Espectrometria de massas (ESI) da amostra do padrão de surfactina

Figura 30- (a) Espectrometria de massas (ESI) da amostra de surfactina produzida por *Bacillus subtilis* em hidrolisado ácido de polpa de sisal (a) na faixa 1022-1045 m/z ; (b) na faixa 1037-1060 m/z

Figura 31- Representação esquemática mostrando o ácido graxo e a sequência do peptídeo dos íons moleculares formados pela fragmentação da surfactina onde n pode ser 13, 14 ou 15 C

5.5 Aplicações do biosurfatante obtido

A lavagem de solos com soluções aquosas são empregadas para solubilizar contaminantes adsorvidos no solo. A solubilidade em água é o mecanismo que controla a remoção, os aditivos como surfatantes, ácidos orgânicos ou inorgânico, NaOH, EDTA, etc., são usados para melhorar a eficácia do processo e reduzir o tempo do tratamento em comparação com lavagens usando somente água (PIÑA, 2012). O uso de surfatante pode reduzir em redor de 80-85% dos contaminantes em experimentos de laboratório, no entanto a quantidade do surfatante utilizada é vital porque este é um fator determinante para a viabilidade econômica do processo além disso, é desejável que o surfatante apresente baixa toxicidade e seja biodegradável (ATTEIA; ESTRADA; BERTIN, 2013).

Os mecanismos de remoção de HC por lavagem são equiparáveis aos envolvidos no incremento da biodisponibilidade de HC na biorremediação, entre os quais pode-se mencionar mecanismos de mobilização, solubilização e emulsificação (FRANZETTI et al., 2009, URUM; PEKDEMIR, 2004b).

O mecanismo de mobilização ocorre em concentrações inferiores a CMC. A redução significativa da tensão interfacial virtualmente elimina as forças de capilaridade que mantêm ligados solo e óleo, deste modo o óleo pode ser enxaguado com água (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). Os BS também podem aumentar a solubilidade dos contaminantes através da formação de micelas quando acima do CMC (ATTEIA; ESTRADA; BERTIN, 2013). O processo de emulsificação se dá

quando gotas pequenas de óleo estão suspensas num fluido, normalmente água (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Avaliou-se o potencial de biorremediação das surfactinas obtidas nos meios propostos, através de lavagem de areia contaminada com diesel.

As soluções (figura 33) usadas para a lavagem de areia contaminada artificialmente com diesel estavam em concentração acima da CMC, uma vez que nestas condições a remoção é mais eficiente (LAI et al., 2009). Foi observado que as águas de lavagens (figura 34) apresentavam uma aparência oleosa e de uma coloração amarela (hidrolisado enzimático) e marrom (hidrolisado ácido), devido a este processo físico transferir os contaminantes do solo a fase líquida. A eficácia da remoção do contaminante neste processo ocorre através de um aumento da solubilidade como foi descrito anteriormente.

Neste estudo o diesel foi deixado em contato com a areia por três dias para simular uma situação real de derrame. Quanto maior o tempo de contato entre o diesel e a areia maior será a adsorção do diesel a superfície, o que provocaria maior aderência na areia, diminuindo a formação de emulsões. Foram observadas mudanças na cor da areia durante a contaminação e lavagens, os quais são uma evidência da quantidade de diesel presentes na areia (figura 35).

As soluções de BS de 0,15 e 0,10 % (p.v⁻¹) produzidos em hidrolisado ácido e enzimático, removeram em 24 horas de lavagem $79,96 \pm 0,01\%$ e $70,35 \pm 0,01\%$ do diesel presente na areia respectivamente, evidenciando-se o potencial dos produtos para serem usados em biorremediação. A maior remoção de diesel pela surfactina obtida no hidrolisado ácido, pode dever-se ao fato que este composto provavelmente possuía traços de ácido e sais que facilitaram a extração do diesel. Quando são formadas as micelas, a parte externa fica carregada negativamente (a surfactina possui em sua estrutura ácido aspártico e glutâmico) havendo maior repulsão entre as micelas, quando é adicionado um eletrólito se produz uma maior concentração de íons na vizinhança das micelas reduzindo as forças eletrostáticas entre as porções polares das micelas, isto aumenta a estabilidade das micelas facilitando a formação destas e como consequência permitindo uma maior solubilidade do diesel (HARRIS, 1992). O uso de diversos aditivos nas lavagens pode melhorar a eficiência do processo atingindo até 95 % de remoção (ATTEIA; ESTRADA; BERTIN, 2013). A

presença de ácido no surfatante também pode aumentar a polaridade da solução facilitando a extração dos aglomerados formados (figura 36) no momento de retirar a água de lavagem.

Soluções de 0,1% de lipopeptídeo SPB1 produzido por *B. subtilis* nas condições de lavagem 200 rpm, 30°C e 24 horas, removeu 87% de diesel de solo contaminado, este resultado foi equiparável aos obtidos para SDS e Tween 80 nas mesmas condições (MNIF et al., 2014). Os BS sintetizados em hidrolisado celulósico de sisal mostraram percentual de remoção próximo aos obtidos para surfatantes sintéticos e biológicos sob condições semelhantes de tratamento e portanto possuem potencial para biorremediação.

Figura 32- Soluções usadas para a lavagem do solo contaminado com biodiesel, a direita surfatante obtido com hidrolisado ácido e a esquerda com hidrolisado enzimático

(a)

(b)

Figura 33- Água de lavagem do solo contaminado, lavagem com solução de surfactina produzida em (a) hidrolisado enzimático; (b) hidrolisado ácido

(a)

(b)

(c)

Figura 34- Coloração da areia limpa - controle (a), contaminada (b) e depois da lavagem (c)

Figura 35- Aspecto dos aglomerados na areia contaminada com diesel depois de 24 horas de agitação com solução de BS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram o potencial de aproveitamento do licor obtido a partir da hidrólise enzimática e ácida da polpa de sisal oriundo da obtenção de nanofibras de celulose. A integração de dois processos para obtenção de produtos com maior valor agregado poderá contribuir para maior valorização do sisal, refletindo diretamente no desenvolvimento das comunidades envolvidas em sua cadeia produtiva.

6. CONCLUSÕES

- As propriedades de superfície demonstradas pelos BS sintetizados indicaram que o licor da hidrólise ácida e enzimática da polpa de sisal podem ser explorados como substratos alternativos para a produção de biossurfatante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332.
- Dentre os dois meios testados, o meio contendo hidrolisado enzimático apresentou as condições mais favoráveis para a obtenção de surfactina, neste meio o micro-organismo adaptou-se mais facilmente e o rendimento de produção de BS semi-purificado foi maior.
- Os biossurfatantes produzidos apresentaram potencial para biorremediação de óleo diesel, observando-se uma maior capacidade de remoção para o BS obtido em hidrolisado ácido.

- Foi verificada a presença de surfactina nas amostras através de espectrometria de massas ESI.

7 PERSPECTIVAS

- Otimização das condições de hidrólise e de fermentação visando melhorar a produção, separação e purificação da surfactina
- Estudar a utilização de hidrolisados contendo hemicelulose visando explorar a capacidade demonstrada por *B. subtilis* em utilizar xilose.
- Utilização do meio de cultivo do hidrolisado ácido diretamente para a lavagem de solos contaminados com diesel, o qual permitiria diminuir os custos gerados no processo de purificação e aliviar o impacto no meio ambiente gerado pelo solventes orgânicos usados neste processo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAS, M. R.; ABDUL, A. J.; KHALIL, M. S.; HAMID, A. A.; MOHD, M. H. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by using treated palm oil mill effluent (POME) as fermentation media. **International Conference on Food and Agricultural Science**, v. 55, p. 87-93, 2013.

ABOUSEOUDA, M.; MAACHIB, R.; AMRANEC, A.; BOUDERGUA, S.; NABIA, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p. 143–151, 2008.

ABUSHADY, H. M.; BASHANDY, S. A.; AZIZ, N. H.; IBRAHIM, H. M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 7, p. 337-344, 2005.

AL-ARAJI, L.; RAHMAN, R.; BASRI, M.; SALLEH, A. Minireview: microbial surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 99-105, 2007.

ALMEIDA, J. R.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 625-638, 2009.

AMITEYE, S.; KOBAYASHI, K.; IMAMURA, D.; HOSOYA, S.; OGASAWARA, N.; SATO, T. *Bacillus subtilis* diacylglycerol kinase (DgkA) enhances efficient sporulation. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 17 p. 5306, 2003.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 488–94, 1968.

ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J. P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 162-168, 1996.

ASK, M.; BETTIGA, M.; DURAISWAMY, V. R.; OLSSON, L. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 181-196, 2013.

ATTEIA, O.; ESTRADA, E.; BERTIN, H. Soil flushing: a review of the origin of efficiency variability. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, p. 378-389, 2013.

AWASHTI, N.; KUMAR, A.; MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. Enhanced biodegradation of endosulfan, a chlorinated pesticide in presence of biosurfactant. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 34, p. 793–803, 1999.

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

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

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

BARROS, F. F.; PONEZI, A. N.; PATORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* Lb5a on a pilot using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1071-1078, 2008.

BERTI, A. D.; GREVE, N. J.; CHRISTENSEN, Q. H.; THOMAS, M. G. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. **Journal of Bacteriology**, v.189, p. 6312–6323, 2007.

BHATTACHARYYA, J. K.; SHEKDAR, A. V. Treatment and disposal of refinery sludges: Indian scenario. **Waste Management and Research**, v. 21, p. 249–261, 2003.

BIRDI, K. S. **Surface and colloid chemistry**. New York: CRC Press, 2010. 48 p.

BLACKWELL, P. S. Management of water repellency in Australia and risks associated with preferential flow, pesticide concentration and leaching. **Journal of Hydrology**, v. 231–232, p. 384–395, 2000.

BLENCKE, H. M.; HOMUTH, G.; LUDWIG, H.; MADER, U.; HECKER, M.; STULKE, J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. **Metabolic Engineering**, v. 5, p. 133-149, 2003.

BRAMWELL, D. P.; LAHA, S. Effects of surfactant addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene. **Biodegradation**, v. 11, p. 263-277, 2000.

BURGOS, C.; MARTÍN, R.; MARTÍNEZ, V.; STORNIOLO, C. E.; TERUEL, J. A.; ARANDA, F. J.; ORTIZ, A.; MANRESA, Á.; FERRER, R.; MARQUÉS, A. M. In vitro study of the cytotoxicity and antiproliferative effects of surfactants produced by *Sphingobacterium detergens*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, p. 433–440, 2013a.

BURGOS, C.; PONS, R.; TERUEL, J.; ARANDA, F. J.; ORTIZ, A.; MANRESA, A.; MARQUÉS, A. M. The production and physicochemical properties of a biosurfactant mixture obtained from *Sphingobacterium detergens*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, p. 368–379, 2013b.

BUSSCHER, H. J.; VAN DER KUIJ-BOOIJ, M.; VAN DER MEI, H. C. Biosurfactants from thermophilic dairy *streptococci* and their potential role in the fouling control of heat exchanger plates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 15-21, 1996.

CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S.; DE VENTER, V. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3643-3649, 2012.

CALVO, C., MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Review: application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. **Future Prospects Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3634-3640, 2009.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262–266, 2004.

CAMEOTRA, S. S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**. v. 8, p. 1–7, 2009.

CARLA, A.; NICHOLSON, M.; FATHEPURE, B. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1222-1225, 2004.

CARVALHO, A. L. U. D.; OLIVEIRA, F. H. P. C. D.; MARIANO, R. D. L. R.; GOUVEIA, E. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 643-652, 2010.

CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S. Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting out and membrane filtration process. **Separation and Purification Technology**, v. 59, p. 244-252, 2008.

CHTIOUI, O.; DIMITROV, K.; GANCEL, F.; NIKOV, I. Biosurfactants production by immobilized cells of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 and their recovery by pertraction. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1795–1799, 2010.

COOPER, D.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 408-412, 1981.

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

COSBY, W. M.; VOLLENBROICH, D.; LEE, O. H.; ZUBER, P. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the spo0K oligopeptide permease and the comQX system of extracellular control. **Journal of Bacteriology**, p. 1438–1445, 1998.

COSTA, Giselle. **Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial: caracterização e aplicações**. 2005. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

COSTA, S. G. V. A. O.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1063–1072, 2009.

CUERVO, L.; FOLCH, J. L.; QUIROZ, R. S. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. **BioTecnología**, v. 13, n. 3, 2009.

DALTIN, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Blucher, 2011, 164 p.

DANIELS, L.; HANSON, R.; PHYLLIPS, J. A. Chemical analysis. In: Methods for general and molecular bacteriology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994. p. 518-519.

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

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, p. 499-504, 2009.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. s5, p. 322-329, 1999.

DE FARIA, A. F.; MARTINEZ, D. S.; BARBOSA, G. N. O.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; TÓTOLA, M. R.; EBERLIN, M. N.; GROSSMAN, M.; ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1951-1957, 2011.

DEHGHAN-NOUDEH, G.; HOUSAINDOKH, M.; BAZZAZ, B. S. F. Isolate, characterization and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 272-276, 2005.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 641-646, 2004.

DE PAULA, M. P.; LACERDA, T. M.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. Adding value to the Brazilian sisal: Acid hydrolysis of its pulp seeking production of sugars and materials. **Cellulose**, v. 19, n. 3, p. 975-992, 2012.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfatante and their comercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DEVELTER, D. W. G.; LAURYSEN, L. M. L. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 628–638, 2010.

DOONG, R.; LEI, W. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *pseudomonas putida* in the presence of surfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 96, n. 1, p. 15-27, 2003.

EDMONDS, P; COONEY, J. J. Lipids of *Pseudomonas aeruginosa* cells grown on hydrocarbons and on trypticase soy broth. **Journal of Bacteriology**, v. 98, n. 1, p. 16-22, 1969.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGOPECUARIA (EMBRAPA). **Sisal**. 2013. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.com/>>. Acesso em: 23 out. 2013.

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I. R.; SANTOS, A. F. B.; ARAÚJO, A. A.; MAIOR, A. M. S.; XIMENES, E. A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 704-709, 2007.

FISHER, S.; SONENSHEIN, A. L. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. **Annual Reviews Microbiology**, v. 45, p. 107-135, 1991.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED STATES.

Statistics. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 17 nov. 2013.

FRANZETTI, A.; CAREDDA, P.; RUGGERI, C.; LA COLLA, P.; TAMBURINI, E.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v. 75, p. 801-807, 2009.

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

FUMA, S.; FUJISHIMA, Y.; CORBELL, N.; D'SOUZA, C.; NAKANO, C. C.; ZUBER, P.; YAMANE, K. Nucleotide sequence of 59 portion of *srfA* that contains the region required for competence establishment in *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, p. 93–97, 1993.

GALLI, G.; RODRIGUEZ, F.; COSMINA, P.; PRATESI, C.; NOGAROTTO, C.; DE FERRA, F.; GRANDI, G. Characterization of the surfactin synthetase multienzyme complex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1205, p. 19–28, 1994.

GAUMAM, K. K.; TIAGI, V. K. Microbial surfatante: A review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, p. 155-166, 2006.

GHARAEI, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: A mini-review. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 1, p. 58-69, 2011.

GIRO, M. E.; MARTINS, J. J.; ROCHA, M. V.; MELO, V. M.; GONÇALVES, L. R. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 738-747, 2009.

GUHA, S.; JAFFÉ, P. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. **Environmental Science and Technology**, v. 30, p. 605-611, 1996.

HARRIS, D. **Análisis Químico Quantitativo**. México. D. F.: Grupo Editorial Iberoamérica, 1992, 103 p.

HE, H.; SHEN, B.; KORSHALLA, J.; CARTER, G. Circulocins, new antibacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2154. **Tetrahedron**, v. 57, p. 1189-1195, 2001.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATKA, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207–1219, 2012.

HEYD, M. KOTHE, A.; TAN, T. H.; NUSSER, M.; KIRSCHHÖFER, F.; BRENNER-WEISS, G.; FRAZEE, 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.

HOFFMAN, D. R.; ANDERSON, P. P.; SCHOBERT, C. M.; GAULT, M. B.; BLANDFORD, W. J.; SANDRIN, T. R. Toxicity of cadmium cobalt and copper during naphthalene biodegradation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2672-2677, 2010.

HORNEMAN, D. A.; WOLBERS, M.; ZOMERDIJK, M.; OTTENS, M.; KEURENTJES, J. T. F.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Surfactant-aided size exclusion chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 39–45, 2004.

INDEX MUNDI: AGRICULTURAL PRODUCTION, SUPPLY AND DISTRIBUTION. **Statistics**. 2013. Disponível em: <<http://www.indexmundi.com/agriculture/>>. Acesso em: 8 jan. 2013.

ISOGAI, A.; TAKAYAMA, S.; MURAKOSHI, S.; SUZUKI, A. Structures of b-amino acids in antibiotics Iturin A. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 30, p. 3065-3068, 1982.

JUWARKAR, A. A.; DUBEY, K. V.; NAIR, A.; SINGH, S. K. Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant - a novel approach. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 142–146, 2008.

KANG, S. W.; KIM, Y. B.; SHIN, J. D.; KIM, E. K. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 780–790, 2010.

KAPPES, R. M.; KEMPF, B.; BREMER, E. Three transport systems for the osmoprotectants glycine betaine operate in *Bacillus subtilis*: characterization of OpuD. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 17, p. 5071, 1996.

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

KAVAMURA, V. N.; ESPOSITO, E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 61-69, 2010.

KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 49, p. 581–590, 2003.

KIM, J.; VIPULANANDAN, C. Removal of lead from contaminated water and clay soil using a biosurfactant. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, p. 777-786, 2006.

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, 2010.

KURIAKOSE, A. P.; MANJOORAN, S. K. B. Utilization of refinery sludge for lighter oils and industrial bitumen. **Energy and Fuel**, v. 8, p. 788–792, 1994.

LACERDA, Talita. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais**. 2012. 258f. Tese (Doutorado em Ciências em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

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

LANDMAN, D.; GEORGESCU, C.; MARTIN, D. A.; QUALE, J. Polymyxins revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 449–465, 2008.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p.151-159, 1999.

LEÃO, Cátia. **Avaliação de tensioactivos de alto peso molecular para sua aplicação na indústria de petróleo**. 2011. 6 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

LIMA, T.; PROCÓPIO, C. L.; BRANDÃO, F. D.; CARVALHO, A. M. X.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v. 22, p. 585-592, 2011a.

LIMA, T.; FONSECA, A. F.; LEÃO, B. A.; MOUNTEER, A. H.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Oil recovery from fuel oil storage tank sludge using biosurfactants. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 2, p. 125, 2011b.

LOMASCOLO, A.; UZAN, E.; SIGOILLOT, J.; FINE, F. Rapeseed and sunflower meal: A review on biotechnology status and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 1105-1114, 2012.

MADHU, A. N.; PRAPULLA, S. G. Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 1777-1789, 2014.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 48-52, 1998.

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

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, M. B. Mini –review: open access advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 5, p. 1-5, 2011.

MARABEZI, Karen. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 158 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. S. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade agave sisalana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

MATA-SANDOVAL, J. C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on the biodegradation of three pesticides in aqueous and soil slurries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3296–3303, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analitical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

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

MISHRA, M; MATHUPRASANNA, P.; PHRABHA, K.; RANI, P.; BABU., A.; CHANDIRAN, I.; 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.

MNIF, I.; BESBES, S.; ELLOUZE-GHORBEL, R.; ELLOUZE-CHAABOUNIA, S.; GHRIBIA, D. Improvement of bread dough quality by *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition: optimized extraction using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3055–3064, 2013.

MNIF, I.; SAHNOUN, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactant' potency for diesel-contaminated soil: optimization of oil desorption using Taguchi design. **Enviromental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 2, p. 851-861, 2014.

MODIG, T.; ALMEIDA, J. R.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G. Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 423-429, 2008.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy and Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006.

MOHD-SETAPAR, S. H.; WAKEMAN, R. J.; TARLETON, E.S. Penicillin G solubilisation into AOT reverse micelles. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 87, p 833–842, 2009.

MOLINA, Maria. **Estudio biofarmaceutico de uma emulsión de vitamina A palmitato liofilizada**. 1994. 14 f. Tese (Doutorado em Farmaceutica) – Departamento de Farmacia y Tecnologia Farmaceutica, Universidad Complutense, Madrid, 1994.

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

MORITA, T.; KONISHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; YAMAMOTO, S.; KITAGAWA, M.; SOGABE, A.; KITAMOTO, D. Identification of *Pseudozyma graminicola* CBS 10092 as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Journal of Oleo Science**, v. 57, p. 123–131, 2008.

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

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 3812-3820, 1999.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOCHUPAPPY, R.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

MWAIKAMBO, L. Y.; ANSELL, M. P. Preparation, characterization, and biodegradability of renewable resource-based composites from recycled polylactide bioplastic and sisal fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 84, p. 2222, 2002.

NAGHMOUCHI, K.; HAMMAMI, R. FLISS, I.; TEATHER, R.; BAAH, J.; DRIDER, D. Colistin A and colistin B among inhibitory substances of *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 363-370, 2012.

NAYAK, A. S.; VIJAYKUMAR, M. H.; KAREGOUDAR, T. B. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 73–79, 2009.

NEILSON, J. W.; ARTIOLA, J. F.; MAIER, R. M. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. **Journal of environmental Quality**, v. 32, p. 899–908, 2003.

NEU, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiological Reviews**, v. 60, p.151–166, 1996.

NEVELL, T. P.; ZERONIAN, S. H. Cellulose chemistry fundamentals. In: NEVELL, T. P.; ZERONIAN, S. H. (Ed). **Cellulose chemistry and its applications**. New York: John Willey, 1985. p. 552.

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

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

NITSCHKE, Marcia. **Produção e caracterização de biossurfatante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. 2004. 38 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004b.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONCÜ, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005a.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V.; CONTEIRO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005b.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactant in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

NOAH, K. S.; FOX, S. L.; BRUHN, D. F.; THOMRSON, D. N.; BALA, G. A. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 803-813, 2001.

NOAH, K. S.; BRUHN, D. F.; BALA, G. A. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 122, p. 465-473, 2005.

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

O'TOOLE, D. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production-a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 363-371, 1999.

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

PAIVA, J. M. F; FROLLINI, E. Unmodified and modified surface sisal fibers as reinforcement of phenolic and lignophenolic matrices composites: thermal analyses of fibers and composites. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 291, p. 405-417, 2006.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Sugar cane baggase pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 125-131, 2005.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91–94, 1997.

PEYPOUX, F.; BESSON, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. **European Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 323-327, 1981.

PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Control biosynthesis of Val-7 and leu-7 surfactins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 515-517, 1992.

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

PIÑA, Oscar. **Lavado in situ de un suelo contaminado con diésel, asistido con surfatantes**. 2012. 24 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura Zacatenco, Ciudad de Mexico, 2012.

PHALAKORNKULE, C.; FRY, B.; ZHU, T.; KOPESEL, K.; ATTAI, M. M.; DOMACH, M. M. ^{13}C NMR evidence for pyruvate kinase flux attenuation underlying suppressed acid formation in *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 169-175, 2000.

PORTILA, O.; MOLDES, A.; TORRADO, A.; DOMÍNGUEZ, J. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1010–1020, 2007.

PORTILLA, O. M.; RIVAS, B.; TORRADO, A.; MOLDES A. B.; DOMÍNGUEZ, J. M. Revalorisation of vine trimming wastes using *Lactobacillus acidophilus* and *Debaryomyces hansenii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2298–2308, 2008.

QUINCENO, David.; MOSQUERA Marvin. **Alternativas tecnológicas para el uso de la cascarilla de arroz como combustible**. 2010. 21 f. Monografía (Bacharelado em Engenharia Mecânica) – Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Occidente, Sntiago de Cali, 2010.

RAGASKAS, J. A.; WILLIAMS, C. K.; DAVINSON, B. H.; BRISTOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPILNSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, p. 484-489, 2006.

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

RAMANA, K. V.; KARANTH, N. G. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. **Biotechnology Letter**, v.11, p. 437–442, 1989.

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, p. 7980–7983, 2010.

REHN, H. J.; REIFF, I. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 19, p. 175-216, 1981.

REKHA, R.; DEKA, S. Removal of hydrocarbon from refinery tank bottom sludge employing microbial culture. **Environmental Science and Pollution**, v. 20, p. 9026–9033, 2013.

RICH, J.; HEICHEN, R.; BOTTOMLEY, P.; CROMACK, J.; MYROLD, D. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5974-5982, 2000.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetics study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 109-116, 2006.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles in biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229–236, 2011.

ROONGSAWANG, N.; THANİYAVARN, J.; THANİYAVARN, S.; KAMEYAMA, T.; HARUKI, M.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin and surfactin. **Extremophiles**, v. 6, p. 499-506, 2002.

ROSENBERG, E.; SCHWARTZ, Z.; TENENBAUM, A.; RUBINOVITZ, C.; LEGMANN, R.; RON, E. Z. A microbial polymer that changes the surface properties of limestone: Effect of biodispersant in grinding limestone and making paper. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 10, p. 241-250, 1989.

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

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Mini-review: biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1005–1016, 2013.

SAHARAN, BS.; SAHU, RK.; SHARMA, D. A Review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, p. 1-14, 2011.

SAIMMAI, A.; SOBHON, V.; MANEERAT, S. Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 315–335, 2011.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; TERUEL, J. A.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; MANRESA, Á.; ORTIZ, A. Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, p. 240–247, 2010.

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

SANTA-ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L.; PEREIRA, JR. N.; FREIRE, D. M. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. n. 2, 159-166, 2002.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, M. V.; REZENDE, S. T. Potencial de palha de cana de açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SAVADOGO, A.; TAPI, A.; CHOLLET, M.; WATHELET, A. S.; TRAORÉ, A. S.; JACQUES, P. Identification of surfactin producing strains in Soumbala and Bikalga fermented condiments using Polymerase Chain Reaction and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 299-306, 2011.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263-289, 2010.

SCHNEIDER, A.; STACHELHAUS, T.; MARAHIEL, M. A. Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 257, p. 308–318, 1998.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, n. 2, p. 123-133, 2008.

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.

SHARMA, S.; SINGH, P.; RAJ, M.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Aqueous phase partitioning of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers by biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* WH-2. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, p. 1178–1182, 2009.

SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110-116, 1987.

SHEPPARD, J. D.; COOPER, D. G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 72-76, 1991.

SIMOES, M.; SIMOES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of the current and emergent biofilm control strategies. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE FIBRAS VEGETAIS DA BAHIA (SINDIFIBRAS). **Sisal**. 2013. Disponível em: <<http://www.brazilianfibras.com.br/>>. Acesso em: 16 nov. 2013.

SINGH, P. B.; SHARMA, S.; SAINI, H. S.; CHADHA, B. S. Biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 378–383, 2009.

SINGH, S. P.; BHARALI, P.; KUMAR, B. Optimization of nutrients requirements and culture conditions for the production of rhamnolipid from *pseudomonas aeruginosa* (MTCC 7815) using *Mesua ferrea* seed oil. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 467-476, 2013a.

SINGH, D. N.; TRIPATHI, A. K. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri* isolated from the formation water of Jharia coalbed. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 215–221, 2013b.

SITOHY, M. Z.; RASHAD, M. M.; SHAROBEEM, S. F.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U.; AL KASHEF, A. S. Bioconversion of soy processin waste for production of surfactant. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 24, p. 2811-2821, 2010.

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; RAY, A.; GUPTA, A.; SEN, R. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2884–2887, 2010a.

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectral analysis of marine lipopeptides with potential therapeutic implications. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v.16, p. 79–85, 2010b.

STACHELHAUS, T.; SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M. A. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. **Science**, v. 269, p. 5571–5574, 1995.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845–857, 2005.

STÜLKE, J.; HILLEN, W. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. **Annual Reviews Microbiology**, v. 54, p. 849-880, 2000.

SUN, L.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; YANG, F. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactin, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *scutellaria baicalensis* georgi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1259–1266, 2006.

TAREK, A. A. M.; GABER, M. A.; SHEREEN, M. S. A. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 2, p. 844-850, 2006.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis* with inorganic cations. **Biotechnology Letter**, v. 14, n. 7, p. 13–18, 1992.

TREVISAN, Christiane. **Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato**. 2012. 144 f. Tese (Doutor em Ciências – Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

TROYANO, M.; BLOCH, C.; CARMONA, A. M.; DI MASCIO, P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. **Microbial Ecology**, v. 57, p. 367–378, 2009.

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

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactant for crude oil soil washing. *Chemosphere*, p. 1139-1150, 2004b.

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

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, p. 895-905, 2010.

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

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANK, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurin whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6210–6219, 2002.

VENKATA, R. K.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 249-257, 1998.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p. 1163-1172, 2001.

WAN, W. M. F.; JAMAL, P.; ALAM, M. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9241–9247, 2010.

WANG, X; NIE, Y; TANG, Y; WU, G; WUA, X. N-alkane chain length alters *Dietzia* sp. strain DQ12-45-1b biosurfactant production and cell surface activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 400-402, 2013.

WATTANAPHON, H. T.; KERDSIN, A.; THAMMACHAROEN, C.; SANGVANICH, P.; VANGNAI, A. S. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 416–423, 2008.

WEI, Y-H.; LAI, C-C.; CHANG, J-S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 40-45, 2007.

WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 155–163, 2008.

WU, C. S. Preparation, characterization, and biodegradability of renewable resource-based composites from recycled polylactide bioplastic and sisal fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, p. 347–455, 2012.

XU, Q.; NAKAJIMA, M.; LIU, Z.; SHIINA, T. Biosurfactant from microbubble preparation and application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 462–475, 2011.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; WRAY, V.; FEDRICKSON, H. L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1706-1713, 1995.

YAO, D.; JI, Z.; WANG, C.; QI, G.; ZHANG, L.; MA, X.; CHEN, S. Coproducing iturin A and poly- γ -glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 985–991, 2012.

ZARAGOZA, A.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; TERUEL, J. A.; MARQUÉS, A.; MANRESA, Á.; ORTIZ, A. A mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. **Langmuir**, v. 25, p. 7892–7898, 2009.

ZHANG, C.; WANG, S.; YAN Y. Isomerization and biodegradation of beta-cypermethrin by *Pseudomonas aeruginosa* CH7 with biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7139–7146, 2011.

ZHAO, J.; LI, Y.; ZHANG, C.; YAO, Z.; ZHANG, L.; BIE, X.; LU, F.; LU, Z. Genome shuffling of *Bacillus amyloliquefaciens* for improving antimicrobial lipopeptide production and an analysis of relative gene expression using FQ RT-PCR. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 889–896, 2012.

ZHEN, Z.; FENGGE, Z.; ZHONG, W.; WEI, R.; QIRONG, S. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 96-102, 2013.

ZHU, Z.; ZHANG, F.; WEI, Z.; RAN, W.; SHEN, Q. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v.127, p. 96-102, 2013.