Jorge Humberto Unás Daza

Produção e caracterização do biossurfatante produzido pela bactéria marinha

Brevibacterium luteolum.

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

2015

AGRADECIMENTOS

- À agência de fomento CNPq;
- Ao Instituto de Química de São Carlos;
- À professora Marcia Nitschke pela orientação;
- Às pessoas do grupo de Biotecnologia microbiana e do grupo de Química Orgânica e Biocatálise do IQSC/USP, que de alguma forma contribuíram à realização deste trabalho.
- Ao povo brasileiro, especialmente aos amigos que fiz durante o mestrado, pelo recebimento ameno e às atenções prestadas.
- Aos amigos da Colômbia em São Carlos.
- À toda minha família, em especial à minha mãe.

" Toda a psicologia da inveja está sintetizada numa fábula, digna de ser incluída nos livros de leitura infantil. Um sapo barrigudo coaxava num lodaçal, quando viu resplandecer no alto de umas pedras um pirilampo. Certo de que nenhum ser tinha o direito de exhibir qualidades que ele próprio jamais possuiria, e mortificado pela sua própria impotência, saltou sobre ele e cobriu-o com o ventre gelado. Por que me tapas? ousou perguntar-lhe o inocente pirilampo. E o sapo, congestionado pela inveja, só soube responder com esta pergunta: E tu, por que brilhas? "

<O homem medíocre>.

José Ingenieros.

RESUMO

Os biossurfatantes (BS) são produtos de origem microbiana com propriedades tensoativas e emulsificantes. Estes compostos são candidatos para substituir os surfatantes sintéticos em aplicações industriais devido à sua menor toxicidade, maior biodegradabilidade, maior diversidade química e maior eficiência e efetividade em condições físicas extremas de salinidade, pressão e temperatura. O uso comercial e industrial dos BS ainda não é sustentável devido a seu alto custo de produção relacionado principalmente ao baixo rendimento. A utilização de substratos de baixo custo e ferramentas estatísticas para melhorar o rendimento de produção dos BS são duas das principais estratégias para tratar este problema. O objetivo do trabalho foi estudar a produção e recuperação do BS produzido por *B. luteolum*, visando o melhoramento na sua produção através do uso do planejamento fatorial e caracterizar a estrutura química do BS. A partir dos resultados, determinou-se que a adsorção em resina foi mais efetiva para a recuperação do BS comparada com a precipitação ácida. A produção do BS foi melhorada através de um planejamento fatorial 2^3 usando como fatores as concentrações da fonte de carbono (vaselina), a fonte de nitrogênio (nitrato de amônio) e a água do mar artificial e como resposta a tensão superficial da solução 0,1% de BS. A maior produção de BS foi obtida com 4% de fonte de carbono, 2% de fonte de nitrogênio e 20% de água do mar artificial gerando tensão superficial de 27 mNm^{-1} . O BS foi caracterizado como uma mistura de lipopeptídeos com ácidos graxos cujo comprimento da cadeia variou entre 10-18 unidades de carbono e um conteúdo de proteína total de 5%. Três estruturas químicas foram sugeridas para os compostos ativos: dois prolina-lipídeos com os ácidos graxos $\text{C}_{16:0}$ e $\text{C}_{18:0}$ respectivamente e um lipopeptídeo com uma sequência peptídica Phe-Al-X-X-Pro-Pro-Thr ($\text{X}=\text{Leu/Ile}$) ligada a uma cadeia de ácido graxo $\text{C}_{16:0}$. Não observou-se atividade antimicrobiana contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* e *S. mutans* nas faixas de concentrações de BS testadas. O uso de vaselina como substrato para a produção do BS sugere que a bactéria e o BS podem ser explorados para aplicações como a biorremediação e a recuperação melhorada de petróleo (EOR).

PALAVRAS CHAVES: Tensão superficial, amberlite XAD-2, planejamento fatorial, lipopeptídeo, prolina-lipídeo.

ABSTRACT

Biosurfactants (BS) are microbial-derived molecules showing tensioactive and emulsification properties. These compounds are candidates to replace synthetic surfactants for industrial applications due to their less toxicity, greater biodegradation capacity, greater chemical diversity and greater efficiency and effectiveness under extreme physical conditions of salinity, pressure and temperature. Commercial and industrial use of BS is not sustainable due their high production cost mainly related to low production yields. The use of low cost substrates and statistical tools to enhance the production yield of biosurfactants are two of the main strategies to deal with that problem. The objective of this work was to study the production and recovery of the BS produced by *B. luteolum*, aiming to enhance its production through a factorial experimental design, and to characterize the chemical structure of the BS. It was found that resin adsorption was more effective than acid precipitation to recover the BS. The production of BS was enhanced through a factorial experimental design 2^3 using the concentrations of the carbon source (mineral oil), the nitrogen source (ammonium nitrate) and artificial seawater as the factors and the surface tension of a solution 0,1% of BS as the response. The value of factors that enhanced the production of BS were 4% of carbon source, 2% of nitrogen source and 20% of artificial sea water showing a surface tension of 27mNm^{-1} . The BS was characterized as a mix of lipopeptides with fatty acid chains varying between 10-18 carbon units and a total protein content of 5%. Three chemical structures were proposed for the active compounds: two proline-lipids with the fatty acid chains $\text{C}_{16:0}$ e $\text{C}_{18:0}$ respectively and a lipopeptide with a peptide sequence Phe-Al-X-X-Pro-Pro-Thr (X=Leu/Ile) linked to a fatty acid chain $\text{C}_{16:0}$. BS did not show antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* and *S. mutans* at concentration range tested. The use of mineral oil as a substrate for the production of the BS suggests that the bacteria and the BS can be explore for applications as bioremediation and enhanced oil recovery (EOR).

KEYWORDS: Surface tension, amberlite XAD-2, factorial design, lipopeptide, proline-lipids.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Surfatantes	14
2.2	Biossurfatantes	18
2.3	Classificação, natureza química e microrganismos produtores	19
2.4	Propriedades dos biossurfatantes	24
2.5	Aplicações dos biossurfatantes	26
2.5.1	Aplicações como agentes antimicrobianos	27
2.6	Produção de biossurfatantes	29
2.6.1	Produção de biossurfatantes por microrganismos marinhos.....	30
2.6.2	Produção de biossurfatantes pelo genero <i>Brevibacterium</i>	31
2.6.3	<i>Brevibacterium luteolum</i>	32
2.7	Substratos alternativos	33
2.8	Extração e purificação de biossurfatantes	35
2.9	Otimização mediante ferramentas estatísticas	37
3	OBJETIVOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	Microrganismo	39
4.2	Meios de cultivo	39
4.3	Produção de Biossurfatante.....	39
4.3.1	Padronização do Inóculo bacteriano	40
4.3.2	Condições de partida para a produção de biossurfatante	40
4.4	Extração do biotensoativo:.....	40
4.4.1	Precipitação ácida	40
4.4.2	Extração com resina de adsorção	41
4.5	Determinação das propriedades tensoativas:.....	42
4.6	Melhoramento da produção usando o planejamento de experimentos:.....	42
4.6.1	Triagem dos fatores significativos	42
4.6.2	Planejamento fatorial.....	43
4.7	Semipurificação do biossurfatante	44
4.7.1	Lavagem do BSb3 com clorofórmio	44

4.8	Purificação do biossurfatante.....	44
4.8.1	Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	44
4.8.2	Análise ultravioleta-visível (UV-vis) do BSb3.....	45
4.8.3	Separação cromatográfica do BS.....	45
4.8.4	Detecção de aminoácidos nas frações coletadas	45
4.8.5	Atividade tensoativa do BS purificado	45
4.9	Caracterização química do BS:	46
4.9.1	Proteína total.....	46
4.9.2	Análise de aminoácidos por cromatografia em papel.....	46
4.9.3	Análise estrutural.....	47
4.9.3.1	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	47
4.9.3.2	Análise de metil ésteres de ácidos graxos (FAME)	47
4.9.3.3	Análise do BS por espectrometria de massa.....	48
4.10	Atividade antimicrobiana.....	48
4.10.1	Meios de cultura	48
4.10.2	Inóculo.....	49
4.10.3	Solução de biossurfatante	49
4.10.4	Técnica empregada.....	49
4.10.5	Leitura	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Produção e extração do biossurfatante.....	51
5.2	Melhoramento da produção usando o planejamento de experimentos:.....	52
5.3	Semi-purificação do biossurfatante.....	58
5.4	Purificação do biossurfatante.....	58
5.4.1	Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	58
5.4.2	Análise ultravioleta-visível (UV-vis) do BSs-p.....	59
5.4.3	Separação cromatográfica do BS.....	60
5.4.4	Detecção de aminoácidos nas frações coletadas	60
5.4.5	Atividade tensoativa do BSp.....	61
5.5	Caracterização química do BS:	62
5.5.1	Proteínas totais	62
5.5.2	Análise de aminoácidos por cromatografia em papel.....	62
5.5.3	Análise estrutural.....	63

5.5.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	63
5.5.3.2 Análise de metil ésteres de ácidos graxos (FAME)	64
5.5.3.3 Análise do BS por espectrometria de massa.....	66
5.6 Atividade antimicrobiana.....	71
6 PRINCIPAIS RESULTADOS	72
7 CONCLUSÃO	73
8 PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de alguns surfatantes. a) surfatante aniônico, b) surfatante catiônico, c) surfatante não iônico e d) surfatante anfotérico ou zwitteriônico.....	14
Figura 2 - Adição progressiva de um surfatante a um sistema bifásico óleo/água. a) surfatante em baixa concentração, b) saturação de todas as interfaces pelo surfatante, c) formação de micelas.	16
Figura 3 - Variação da tensão superficial versus o logaritmo da concentração de surfatante em solução.	17
Figura 4 - Formação de emulsões na presença de surfatante. a) emulsão óleo em água e, b) emulsão água em óleo.	18
Figura 5 - Estrutura geral de alguns biossurfatantes.....	23
Figura 6 - a) Coloração de Gram e b) cultivo em meio sólido de <i>B. luteolum</i>	33
Figura 7 - Análise filogenética baseada na sequência parcial de rRNA 16S da cepa AC189a.	33
Figura 8 - Esquema global da metodologia.....	41
Figura 9 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 23 (as barras que ultrapassam a linha vertical vermelha indicam fatores significativos, com 95% de confiança).....	54
Figura 10 - Superfícies de resposta e gráficos de contorno relativos às concentrações de carbono e de ASW frente às diferentes concentrações de nitrogênio testadas: a) 0,5%N b) 1%N e c) 2%N.....	55
Figura 11 - Superfície de resposta e gráfico de contorno relativos à razão C/N e à concentração de ASW.....	57
Figura 12 - Ilustração da cromatoplaça do BSs-p produzido por <i>B. luteolum</i> . A mancha de cor roxa com Rf = 0,91 refere-se ao resultado positivo para aminoácidos.	59
Figura 13 - Espectro de varredura na região Ultravioleta-visível do BSs-p produzido por <i>B. luteolum</i>	59
Figura 14 - Cromatograma do BSs-p produzido por <i>B. luteolum</i> obtido no separador automático. As linhas roxa, azul, cinza e verde escura correspondem à absorbância UV a 234nm, 206, 220 e 258nm respectivamente. A linha verde clara indica o gradiente crescente de metanol.	60

Figura 15 - Espectros de varredura ultravioleta-visível das frações cromatográficas derivatizadas com ninhidrina. Os picos de absorção em 512nm indicam a presença de aminoácidos nas frações 7 e 8.....	61
Figura 16 - Curva padrão obtida pelo método de Lowry para a quantificação de proteínas totais.....	62
Figura 17 - Ilustração da cromatografia de papel da análise de aminoácidos do BS produzido por <i>B. luteolum</i> . a) Mancha da prolina ($R_f = 0,54$), b) mancha do BSb3 ($R_f = 0,54$) e c) mancha do BSp ($R_f = 0,56$).....	63
Figura 18 - Espectro infravermelho do BSb3 (preto) e do BSp (vermelho) do BS produzido por <i>B. luteolum</i>	64
Figura 19 - Cromatogramas do a) BSb3 e b) do BSp após metanólise. Os picos numerados correspondem a 5 tipos de FAME diferentes.	65
Figura 20 - Espectro de massa do BSb3 produzido por <i>B. luteolum</i> na faixa de 105-1300m/z.....	67
Figura 21 - a) Fragmentação por CID (30,00eV) do íon molecular $[M+H]^+$ de $m/z = 381$. b) Estrutura molecular sugerida para o composto associado a esse íon molecular.....	67
Figura 22 - a) Fragmentação por CID (30,00eV) do íon molecular $[M+H]^+$ de $m/z 353$. b) Estrutura molecular sugerida para o composto associado a esse íon molecular..	68
Figura 23 - a) Fragmentação por CID (28,00eV) do íon molecular $[M+H]^+$ de $m/z 979$. b) Estrutura molecular sugerida para o composto associado a esse íon molecular..	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de biossurfatantes e microrganismos envolvidos na sua produção	24
Tabela 2 - Principais aplicações industriais dos biossurfatantes.....	27
Tabela 3 - Microrganismos marinhos produtores de BS.	31
Tabela 4 - Principais substratos de baixo custo utilizados na produção de BS.....	35
Tabela 5 - Principais processos de recuperação de biossurfatantes.	37
Tabela 6 - Codificação a dois níveis dos potenciais fatores significativos na produção de biossurfatante.....	43
Tabela 7 - Planejamento fatorial 2^3 com duas réplicas do ponto central.	43
Tabela 8 - Produção e extração do biossurfatante nas condições de partida.	51
Tabela 9 - Rendimentos em massa e tensões superficiais do BSb2 e o BSb3 obtidos no planejamento fatorial.	53
Tabela 10 - Compostos preditos por CG-EM no BSb3 e no BSp.....	66

1 INTRODUÇÃO

Os surfatantes representam uma classe importante de compostos químicos amplamente empregados em uma grande variedade de aplicações industriais (DEVELTER; LAURYSEN, 2010; FRANZETTI et al., 2010; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007) e sua produção mundial foi estimada em mais de 15 milhões de toneladas no ano 2011 (TMR, 2012).

Devido ao fato de que a grande maioria dos surfatantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir do petróleo, existe uma crescente preocupação ambiental por parte dos consumidores, que combinada com novas legislações de controle do meio ambiente, levaram à procura de surfatantes naturais como alternativas aos produtos existentes (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

Os biossurfatantes produzidos por microrganismos são a alternativa natural para esses processos, pois possuem uma série de vantagens sobre os surfatantes sintéticos; como sua baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, maior efetividade e eficiência em um amplo espectro de pH, temperatura e salinidade e, a possibilidade de serem produzidos a partir de substratos renováveis; características desejáveis para diversas aplicações comerciais (CAMEOTRA; MAKKAR, 2010; KOGLIN; DOETSCH; BERNHARD, 2010; LIMA et al., 2011; MULLIGAN, 2009; XU et al., 2011). Entre essas aplicações, destacam-se a recuperação de petróleo, biorremediação de poluentes, formulação de lubrificantes, formulação de cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos, além de seu uso como agentes antimicrobianos (BANAT et al., 2010; CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; GHARAEI-FATHABAD, 2011; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2009; MUKHERJEE; DAS, 2010; NITSCHKE; COSTA, 2007).

Os microrganismos marinhos têm desenvolvido características fisiológicas e metabólicas únicas que permitem a síntese de novos metabólitos ainda não observados em microrganismos terrestres. O ambiente marinho representa um reservatório enorme de biodiversidade microbiana, cuja vasta maioria ainda não foi identificada, classificada e tampouco cultivada (KENNEDY; MARCHESI; DOBSON,

2008). Portanto, os habitats marinhos constituem uma grande oportunidade de descobrir novos compostos produzidos por esses microrganismos, tais como antibióticos, enzimas, vitaminas, drogas, biossurfatantes, bioemulsificantes e outros compostos de importância comercial (SATPUTE et al., 2010a).

Entre os microrganismos marinhos produtores de BS destacam algumas espécies de *Halomonas*, *Nocardiopsis*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Myroides* e *Yarrowia* (DAS et al., 2010). Recentemente espécies do gênero *Brevibacterium* isoladas de ambientes marinhos foram relatadas como produtoras de biossurfatantes (KIRAN et al., 2009; KIRAN; SABU; SELVIN, 2010; VILELA et al., 2014). Entre elas, se destaca a bactéria marinha *Brevibacterium luteolum* pelo fato de produzir um biossurfatante de propriedades tensoativas superiores aos BS produzidos pelas outras bactérias do mesmo gênero. A alta capacidade tensoativa do BS produzido por *B. luteolum* foi observada inicialmente no Grupo de Biotecnologia Microbiana (VILELA, 2014) e comparada com a capacidade tensoativa de BS destacados como a surfatina e os ramnolipídeos. Apesar disso, o baixo rendimento de produção desse BS dificulta a purificação e caracterização estrutural do mesmo, constituindo um fator limitante para seu uso larga escala.

Além do baixo rendimento, a aplicação industrial dos biossurfatantes é limitada devido ao uso de substratos de alto custo e a biossíntese de misturas de moléculas tensoativas (SYLDATK; HAUSMANN, 2010). Três estratégias principais têm sido propostas com o objetivo de tornar economicamente mais competitiva a produção de biossurfatantes: 1) O uso de substratos de baixo custo, 2) o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes, tais como a otimização das condições de cultivo e processos de separação mais efetivos que maximizem a recuperação do biossurfatante, e 3) desenvolvimento e uso de cepas mutantes ou recombinantes superprodutoras (BOGNOLO, 1999; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

O uso de substratos de baixo custo na produção de BS (1^{ra} estratégia) inclui o uso de produtos de descarte e subprodutos agroindustriais. Vilela et al. (2014) usaram a vaselina (um subproduto do refino do petróleo) como substrato para a produção de BS por *B. luteolum*. A habilidade demonstrada pela bactéria em crescer

neste substrato hidrofóbico como sua única fonte de carbono sugere que ela pode ser empregada em aplicações, tais como, a bioremediação ou a recuperação melhorada de petróleo EOR.

O uso de ferramentas estatísticas experimentais como o planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta são úteis para a otimização das condições de cultivo e maximização da produção de biossurfatantes (2ª estratégia) (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

O foco deste trabalho foi estudar a produção e recuperação do BS produzido por *B. luteolum*, visando o melhoramento na sua produção através do uso do planejamento fatorial para sua posterior purificação e caracterização estrutural. Adicionalmente o biossurfatante foi avaliado como agente antimicrobiano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfatantes

Os surfatantes são moléculas de natureza anfipática contendo na sua estrutura um domínio apolar e um domínio polar. O domínio apolar é geralmente uma cadeia hidrocarbonada e o domínio polar pode ser de caráter iônico, não iônico ou anfotérico (DESAI; BANAT, 1997; LUNA et al., 2013).

Figura 1 - Estrutura de alguns surfatantes. a) surfatante aniônico, b) surfatante catiônico, c) surfatante não iônico e d) surfatante anfotérico ou zwitteriônico.

A presença de um domínio hidrofóbico e um domínio hidrofílico na mesma molécula faz com que os surfatantes apresentem a tendência a distribuir-se na interface entre fases com diferentes polaridades (óleo/água ou ar/água) adquirindo a forma de um filme molecular ordenado que reduz a tensão interfacial, dando aos surfatantes suas características únicas (BANAT et al., 2010; CAMPOS et al., 2013; SATPUTE et al., 2010b). Essa propriedade tensoativa faz com que os surfatantes sejam compostos adequados para várias aplicações industriais e domésticas envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (DEVELTER; LAURYSEN, 2010; NITSCHKE; PASTORE, 2002). A produção de surfatantes foi estimada em mais de 15 milhões de toneladas no ano 2011 (TMR, 2012), sendo esse alto volume de produção um indicativo da grande importância destes compostos na indústria química.

Quando um surfatante é adicionado em um sistema bifásico, por exemplo óleo/água, ele tende a se posicionar na interface entre os dois líquidos (Figura 2a) favorecendo a estabilização da molécula anfipática em um maior grau do que a interface água/ar. O aumento progressivo da concentração de surfatante no sistema ocasiona a saturação da interface óleo/água e favorece o posicionamento dessas moléculas nas interfaces água/ar e água/sólido (Figura 2b). Se a adição continuar até a saturação de todas as interfaces disponíveis, as moléculas de surfatante começam a interagir entre elas, através de seus domínios. Em água, os domínios apolares aglomeram-se entre si, deixando os domínios polares expostos ao meio, formando estruturas denominadas micelas (Figura 2c). Ao contrário, em óleo; ocorre a interação entre os domínios polares e os domínios apolares ficam expostos ao meio, formando estruturas denominadas micelas inversas (DALTIM, 2011).

Figura 2 - Adição progressiva de um surfatante a um sistema bifásico óleo/água. a) surfatante em baixa concentração, b) saturação de todas as interfaces pelo surfatante, c) formação de micelas.

Quando o surfatante é dissolvido em um líquido único as moléculas tendem a agrupar-se na superfície (ar/água) e na interface água/sólido como primeira opção para se estabilizar. Como uma resposta física à presença destas moléculas na superfície, a tensão superficial da solução é reduzida pela adição progressiva de surfatante, até atingir um valor mínimo independentemente da quantidade que se adicione. Esse mínimo de tensão superficial é atingido quando a superfície do sistema se satura com surfatante e se inicia a formação de micelas (Figura 3) sendo esta concentração denominada de CMC (concentração micelar crítica) (DALTIM, 2011; ISLAS; MORENO; RODRÍGUEZ, 2010).

Figura 3 - Variação da tensão superficial versus o logaritmo da concentração de surfatante em solução.

A CMC é uma propriedade físico-química única de cada surfatante e é ao mesmo tempo uma medida da sua eficiência. Quanto mais baixo o valor da CMC, menos surfatante será requerido para reduzir a tensão superficial e maior sua capacidade de formar emulsões para solubilizar compostos orgânicos em meio aquoso (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

A capacidade emulsificante de um surfatante é uma propriedade que se manifesta em concentrações acima da CMC. Um sistema bifásico do tipo óleo/água, se submetido a agitação vigorosa apresentará pequenas gotículas de óleo em água (ou vice-versa); as quais irão se fusionando progressivamente para atingir a separação de fases inicial. Essa fusão de gotículas é denominada coalescência. Se o mesmo sistema for agitado na presença de um surfatante em concentração acima do seu CMC as gotículas formadas serão estabilizadas formando uma emulsão. Isto ocorre porque as gotículas oferecem interfaces óleo/água onde as moléculas de surfatante se agrupam abandonando a conformação micelar que é menos estável (Figura 4). Uma vez na superfície das gotículas, as moléculas de surfatante exercem repulsão eletrostática ou impedimento estérico entre seus domínios, evitando a coalescência (DALTIM, 2011).

Figura 4 - Formação de emulsões na presença de surfatante. a) emulsão óleo em água e, b) emulsão água em óleo.

2.2 Biossurfatantes

Uma grande variedade de organismos vivos sintetizam compostos com propriedades tensoativas, desde microrganismos até animais superiores como o ser humano (sais biliares). Esses compostos são empregados para atividades intra e extracelulares, tais como emulsificação de nutrientes, intercâmbio de materiais através das membranas celulares ou reconhecimento celular (BOGNOLO, 1999).

Compostos de origem microbiana com alta capacidade tensoativa e capacidade emulsificante (principais propriedades surfatantes), se denominam biossurfatantes. A maioria dos biossurfatantes são produzidos por bactérias (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Embora, a função fisiológica dos biossurfatantes nos microrganismos produtores ainda não tenha sido totalmente compreendida, algumas funções são atribuídas a estes compostos. Um dos papéis mais importantes associados aos biossurfatantes é a emulsificação de compostos hidrofóbicos através de fenômenos de dessorção, incrementando a sua solubilidade em meio aquoso e a superfície de contato entre o substrato hidrofóbico e o microrganismo produtor facilitando sua transferência através da superfície celular. Os BS também podem contribuir na

adesão e formação de filmes microbianos nas interfaces ou superfícies, como também, no desprendimento e mobilidade microbianos na procura de novos ambientes para o crescimento, reprodução e colonização (KEARNS; LOSICK, 2003; RON; ROSENBERG, 2001). Outra função associada aos BS é a atividade antimicrobiana, que representa uma vantagem competitiva na sobrevivência do microrganismo frente a condições nutricionais e ambientais adversas. A capacidade molhante e dispersante do BS produzido por *Pseudomonas fluorescens* contribui para acelerar o processo de infecção do hospedeiro (HILDEBRAND et al., 1998), no entanto, a participação dos BS como fatores de patogêneses tem sido pouco reportada.

2.3 Classificação, natureza química e microrganismos produtores

Em contraste com os surfatantes sintéticos, cuja classificação é baseada na natureza do grupo polar, os biossurfatantes são classificados de acordo com a sua composição química e microrganismo produtor (BANAT et al., 2010; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Os microrganismos produtores de biossurfatantes se distribuem em uma ampla variedade de gêneros. As classes de surfatantes mais destacadas incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfatantes poliméricos e surfatantes particulados (DESAI; BANAT, 1997; AMARAL et al., 2010; CAMEOTRA; MAKAR, 2010; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Os glicolipídeos são os biossurfatantes mais estudados. Sua estrutura geral consiste em um mono ou dissacarídeo (domínio polar) ligado covalentemente a uma cadeia longa de ácido graxo alifático ou de ácido graxo β -hidroxialifático (domínio apolar). Os glicolipídeos mais conhecidos são os ramnolipídeos, soforolipídeos, trehalolipídeos (DESAI; BANAT, 1997).

Os ramnolipídeos são glicolipídeos formados pela união de uma ou duas moléculas de L-ramnose com uma ou duas cadeias de ácido graxo β -hidroxialifático, através de uma ligação β -glicosídica (MÜLLER et al., 2012). A variação estrutural faz que existam 4 tipos principais de ramnolipídeos: i) os mono-ramnolipídeos Rh1, os quais contêm uma ramnose ligada a dois ácidos graxos β -hidroxialifático, ii) os di-

ramnolipídeos Rh2 os quais contém duas ramnoses ligadas a dois ácidos graxos β -hidroxialifáticos, iii) os tri-ramnolipídeos Rh3 os quais contém uma ramnose ligada a um ácido graxo β -hidroxialifático, e iv) tetra-ramnolipídeos Rh4 os quais contém duas ramnoses ligadas a um ácido graxos β -hidroxialifático. As cadeias de ácido graxo podem ser saturadas ou insaturadas e seu comprimento pode variar significativamente. O Rh1 L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e o Rh2 L-ramnosil-L-ramnosyl- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Figura 5a,b) são os principais ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (IRFAN-MAQSOOD; SEDDIQ-SHAMS, 2014).

Os soforolipídeos são formados pela união de uma soforose (um dissacarídeo com uma ligação β -1-2 glicosídica) a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxialifático (Figura 5c). Este tipo de glicolipídeo é produzido principalmente por leveduras como *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum* e *T. apicola* (VAN BOGAERT; ZHANG; SOETAERT, 2011).

Os trealolipídeos ou trealose lipídeos são glicolipídeos formados pela união entre uma trealose (um dissacarídeo com uma ligação α,α -1,2 glicosídica) e uma ou duas cadeias de ácido micólico (ácido graxo α -ramificados- β -hidroxilado). As cadeias de ácido micólico variam em comprimento e instauração dependendo do microrganismo produtor. O trealolipídeo mais estudado é o trealose 6,6'-dimicolato produzido por *Rhodococcus erythropolis* (Figura 5d). Outras espécies produtoras de este tipo de glicolipídeo estão distribuídas em uma ampla variedade de gêneros, incluindo *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter* e *Gordonia* (FRANZETTI et al., 2010).

Os lipopeptídeos são outra classe de biossurfatantes cuja estrutura geral consiste em um peptídeo linear ou cíclico (domínio polar) ligado covalentemente a uma cadeia longa de ácido graxo (domínio apolar). A surfactina, a iturina e a fengicina são os lipopeptídeos mais destacados, os quais são sintetizados por *Bacillus subtilis*.

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico formado por um heptapeptídeo (2 D-aminoácidos: Leu, Leu; e 5 L-aminoácidos: Val, Asp, Leu, Glu e Leu) ligado a uma

cadeia de ácido graxo β -hidroxialifático de 12 a 16 carbonos (Figura 5e). A ordem dos resíduos de aminoácidos e o comprimento da cadeia de ácido graxo podem variar dependendo da cepa bacteriana e das condições de cultura. De fato, a surfactina é usualmente biossintetizada como uma mistura de isoformas de peptídeos com cadeias lipídicas de tamanho variável (MEENA; KANWAR, 2015).

A iturina é o lipopeptídeo cíclico de menor massa molecular (1,1kDa) produzido por *Bacillus subtilis*. Sua estrutura é constituída por um heptapeptídeo (3 D-aminoácidos: Tyr, Asn e Asn; e 4 L-aminoácidos: Pro, Ser, Asn e Gln) ligado a uma cadeia de ácido graxo β -aminoalifática de 14 a 17 carbonos (MEENA; KANWAR, 2015). As 7 variantes principais de iturina produzidas por *B. subtilis* são: Iturina A e C, bacilomicina D, F, L e LC e micosubtilina (ONGENA; JACQUES, 2008).

A fengicina também é um lipopeptídeo cíclico, estruturalmente constituído por um decapeptídeo (4 D-aminoácidos: Tyr, Orn, Thr e Ala; e 6 L-aminoácidos: Glu, Glu, Pro, Gln, Tyr, and Ile) ligado a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxialifático de 14 a 18 carbonos, a qual pode ser saturada ou insaturada (MEENA; KANWAR, 2015; ONGENA; JACQUES, 2008).

Os fosfolipídeos são outra classe de biossurfatantes constituídos estruturalmente por uma cadeia longa de ácido graxo ligada a um agrupamento fosfato. Uma variedade de microrganismos como *Acinetobacter* sp, *Aspergillus* spp, *Theobacillus theoxidants* e *Rhodococcus erythropolis* têm sido referidos como produtores de fosfolipídeos (DESAI; BANAT, 1997).

Uma forma de classificação alternativa consiste em agrupar os biossurfatantes de acordo com seu peso molecular. Os glicolipídeos e os lipopeptídeos são definidos como biossurfatantes de baixo peso molecular, enquanto que certos polímeros anfifílicos (lipopolisacarídeos e ácidos lipoteicóicos) e polifílicos (polissacarídeos hidrofóbicos e emulsan) são definidos como biossurfatantes de alto peso molecular. Estes últimos são reconhecidos pela sua maior capacidade de estabilizar emulsões (com baixos valores de CMC), pelo qual são comumente chamados de bioemulsificantes. Uma grande variedade de microrganismos, incluindo fungos e arqueias tem sido relatados como produtores de

bioemulsificantes, dos quais os mais estudados são os bioemulsans produzidos por várias espécies de *Acinetobacter* (FRANZETTI et al., 2010). A estrutura química dos bioemulsificantes inclui vários grupos químicos, por exemplo, o emulsan é formado por um esqueleto de heteropolissacarídeos com vários ácidos graxos ligados a ele através de toda a estrutura (Figura 5f) (ROSENBERG; RON, 1999). Na Tabela 1 são mostrados os principais tipos de surfatantes relatados na literatura.

Figura 5 - Estrutura geral de alguns biossurfatantes.

F

Fonte: Adaptada de CAMEOTRA; MAKAR, 1998; ONGENA; JACQUES, 2008

Tabela 1 - Principais classes de biossurfatantes e microrganismos envolvidos na sua produção

Tipo de Biossurfatante	Microrganismos
Glicolipídeos	
- Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i>
- Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erithropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> ssp.
- Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i>
- Manosileritritol lipídeos	<i>Candida antártica</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>L. mesenteroides</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- iturina	
- fengicina	
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>
- Gramicidinas	<i>Bacillus brevis</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i> , <i>P. spiculispore</i>
- Lipídeos neutros	<i>Nocardia erithropolis</i>
- Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfatantes poliméricos	
- Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- Biodispersan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
- Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfatantes particulados	
- Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Células	Várias bactérias

Fonte: Adaptada de DESAI; BANAT, 1997

2.4 Propriedades dos biossurfatantes

Apesar de sua diversidade de composição química e propriedades, a maioria dos biossurfatantes têm características comuns. Muitas dessas características constituem vantagens com respeito aos surfatantes sintéticos (BOGNOLO, 1999; SOBERÓN-CHÁVEZ; MAIER, 2011):

Atividade superficial e interfacial: os biossurfatantes são mais efetivos e eficientes do que os surfatantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), porque reduzem mais a tensão superficial com menores concentrações de surfatante (COOPER; PADDOCK, 1984). Os biossurfatantes mais efetivos podem diminuir a tensão superficial da água de 72 para 30 mNm⁻¹ e a tensão interfacial entre água/hexadecano de 40 para 1mNm⁻¹. Além disso, os BS são mais eficientes, ou seja; apresentam CMC mais baixa do que os surfatantes sintéticos. Isso significa que menores concentrações de biossurfatante são requeridas para redução máxima da tensão superficial (DESAI; BANAT, 1997; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). Segundo Mulligan (2009), a CMC dos biossurfatantes varia entre 1-2000 mg/L.

Tolerância à temperatura, pH e força iônica: Alguns biossurfatantes exibem uma elevada estabilidade térmica e de pH, sendo úteis em ambientes com condições drásticas. Segundo Bognolo (1999) os biossurfatantes conservam sua atividade tensoativa em temperaturas de até 90°C e em concentrações de NaCl superiores à 10%, sendo que uma concentração salina entre o 2-3% geralmente reduz a atividade dos surfatantes convencionais.

Biodegradabilidade: diferente de muitos surfatantes sintéticos, os biossurfatantes são facilmente biodegradáveis em água e solo, o que faz que sejam úteis para aplicações ambientais tais como biorremediação e tratamento de resíduos (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFA; HASSOUNA, 2009; CAMPOS et al., 2013; MARCHANT; BANAT, 2012; MULLIGAN, 2009).

Baixa toxicidade: muitos biossurfatantes são considerados compostos de baixa toxicidade sendo adequados na elaboração de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

Outras vantagens dos biossurfatantes são a possibilidade de serem produzidos a partir de substratos renováveis e sua grande diversidade química (DESAI; BANAT, 1997). As características dos BS podem ser alteradas através de modificações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo a obtenção de produtos úteis para necessidades específicas. Finalmente, está a vantagem de que os biossurfatantes

não são derivados do petróleo, o que é importante na medida de que os preços do petróleo aumentam (DE ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

2.5 Aplicações dos biossurfatantes

A indústria petrolífera constitui o maior mercado para os biossurfatantes, sendo usados no processo de extração de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes (CAMPOS, 2013). Outros campos de ação destes compostos incluem a agricultura, as indústrias de alimentos, têxteis, fármacos, cosméticos, higiene pessoal, detergentes, papel e celulose, tintas e mineração (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Um resumo dos usos industriais dos biossurfatantes é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais aplicações industriais dos biossurfatantes.

Usos industriais	Propriedades								
	Emulsificantes	Desemulsificantes	Dispersantes	Molhantes	Detergência	Espumante	Antiaderente	Inibidor da corrosão	Antibiótico
Agricultura	x		x	x					x
Alimentos e bebidas	x		x	x	x	x			
Mineração/construção				x		x		x	
Limpeza industrial				x	x			x	
Plásticos/elastômeros	x		x	x		x	x		
Couros	x			x	x				
Têxteis	x		x	x	x		x		
Metais	x			x		x			
Pintura/revestimentos industriais	x			x			x		
Indústria de petróleo	x	x	x	x	x	x	x	x	
Papel				x	x				
Cosméticos	x			x		x	x		x

Fonte: Adaptada de HELMY et al., 2011

2.5.1 Aplicações como agentes antimicrobianos

Além da ampla utilidade na bioremediação e remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos, na recuperação de petróleo e em vários setores industriais, alguns biossurfatantes têm se destacado como agentes antibacterianos, antifúngicos e antivirais (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; RODRIGUES et al., 2006a; SINGH; CAMEOTRA, 2004).

Os BS apresentam-se como alternativas efetivas e seguras (de baixa toxicidade), ante a demanda global por agentes antimicrobianos capazes de combater infecções causadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos convencionais (BANAT et al., 2010). Uma publicação do 2011 da sociedade americana de doenças infecciosas (IDSA) informou que somente nos EUA são destinados entre 21 e 34 bilhões de dólares por ano em tratamentos contra este tipo de infecções (SPELLBERG et al., 2011). Nesse sentido, a utilização terapêutica de BS poderia compensar o custo de produção destes compostos pelos benefícios apresentados.

Os lipopeptídeos são a classe de biossurfatantes com maior destaque em relação a atividade antimicrobiana. Entre eles se destacam a surfatina, fengicina, iturina, bacilomicinas e micosubtilinas produzidas por *Bacillus subtilis*, assim como também lichenisina, pumilacidina e polimixina B produzidos por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus polymyxa* respectivamente. A polimixina B, por exemplo, é um agente antibacteriano catiônico que se liga à membrana externa (aniônica) de uma grande variedade de patógenos Gram-negativos, exercendo um efeito detergente que destrói a integridade da membrana (LANDMAN et al., 2008). Kiran et al. (2010) relataram a atividade antimicrobiana de um lipopeptídeo produzido pela bactéria marinha *Brevibacterium aureum* MSA13. Esse biossurfatante denominado brevifactina mostrou uma alta atividade contra *Candida albicans* e *Klebsiella pneumoniae*.

Vários glicolipídeos têm demonstrado ação antimicrobiana, destacando-se os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (BENINCASA et al., 2004; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2010), manosileritritol lipídeos produzidos por *Candida antarctica* (ARUTCHELVI et al., 2008) e soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* (SLEIMAN et al., 2009). Um glicolipídeo produzido pela bactéria marinha *Brevibacterium casei* apresentou atividade bacteriostática e ação anti-biofilme contra os patógenos *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2453 e *Escherichia coli* MTCC 2339 (KIRAN; SABARATHNAM; SELVIN, 2010).

2.6 Produção de biossurfatantes

Além dos fosfolipídeos de membrana, alguns microrganismos possuem a capacidade de produzir moléculas anfifílicas tais como glicolipídeos, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (FRANZETTI et al., 2012). Uma vez produzidas, essas moléculas (biossurfatantes) podem ser mantidas no interior das células, aderidas às membranas ou excretadas para o meio (DE ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; DESAI; BANAT, 1997).

Um fator muito importante na produção de biossurfatantes é a fonte de carbono. É reconhecida a capacidade de muitos microrganismos, de produzir diferentes tipos de biossurfatantes quando são cultivados com diferentes fontes de carbono (AL-ARAJI et al., 2007). Estas fontes de carbono incluem carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais (KIM et al., 1997). Além disso, o tipo, a qualidade e a quantidade do biossurfatante são influenciados, não só pelo tipo de fonte de carbono, mas também pela concentração de nitrogênio, fosfatos, íons metálicos no meio e as condições de cultivo como pH, temperatura, agitação e aeração (GUERRA-SANTOS; KÄPPELI; FIECHTER, 1986; LIN, 1996). Em termos gerais, a modificação do substrato frequentemente ocasiona alterações na estrutura do biossurfatante produzido e, conseqüentemente, nas suas propriedades (REISER et al., 1989).

As fontes de nitrogênio usadas para a produção de biossurfatantes dependem do microrganismo produtor e incluem desde fontes complexas como milhocina, peptonas, farinha de peixe, uréia e autolisado de leveduras, até fontes inorgânicas simples como nitrato de amônio, sulfato de amônio e outros (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

A concentração de nitrogênio é um fator de regulação importante para a produção de biossurfatante. Segundo Desai e Banat (1997) a limitação de nitrogênio favorece a produção de biossurfatante. Guerra-Santos et al. (1986) encontraram uma produção máxima de ramnolipídeos após limitação de nitrogênio usando uma relação carbono/nitrogênio (C/N) entre 16:1 a 18:1 e ausência de produção com uma relação C/N de 11:1, mas sem limitação de nitrogênio. Segundo Hommel et al.

(1987b), o rendimento de biomassa na produção de *Torulopsis apicola* depende principalmente da quantidade absoluta de nitrogênio e não de sua concentração relativa, enquanto que a concentração da fonte de carbono determina a conversão do carbono disponível a biossurfatante. No entanto, a limitação de nitrogênio não é uma regra fixa na produção de BS. Kiran et al. (2010) relataram produção máxima de lipopeptídeo por *Brevibacterium aureum* utilizando relação C/N de 0,5 evidenciando que uma concentração alta de nitrogênio comparada com a concentração de carbono favoreceu a produção do biossurfatante.

2.6.1 Produção de biossurfatantes por microrganismos marinhos

A hidrosfera marinha ocupa três quartos da superfície terrestre, sendo um enorme reservatório de biodiversidade microbiana, em sua maioria não explorada nem pesquisada; incluindo microrganismos produtores de biossurfatantes. A grande biodiversidade dos últimos, junto com a sua capacidade de habitar em condições extremas de pressão, temperatura e salinidade, faz que os BS de origem marinha apresentem uma grande diversidade estrutural e funcional constituindo-se em moléculas atrativas ao setor industrial (SATPUTE et al., 2010b).

A produção de BS por microrganismos marinhos tem sido associada principalmente à sua capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos em meio aquoso para que estes possam ser usados como substratos pelo microrganismo. Esta propriedade faz com que os BS de origem marinha possam ser úteis para incrementar a transferência de massa em diferentes processos industriais e na bioremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos (DE CARVALHO; FERNANDES, 2010).

Entre os principais microrganismos marinhos produtores de BS se encontram algumas espécies de *Halomonas*, *Nocardiopsis*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Myroides* e *Yarrowia* (DAS et al., 2010). Alguns dos microrganismos marinhos relatados como produtores de BS são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Microrganismos marinhos produtores de BS.

Biossurfatante	Microrganismo	Referência
Glicolipídeos	<i>Streptomyces</i> sp.	(MANIVASAGAN et al., 2014)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	(WHITE; HIRD; ALI, 2013)
	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	(KIRAN; THOMAS; SELVIN,
	<i>Brevibacterium casei</i>	(KIRAN; SABU; SELVIN, 2010)
	<i>Halomonas</i> sp.	(DHASAYAN; KIRAN; SELVIN, 2014)
Lipopeptídeos e amino-lipídeos	<i>Bacillus circulans</i>	(DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008)
	<i>Bacillus megaterium</i>	(RANGARAJAN et al., 2012)
	<i>Bacillus mojavensis</i>	(MA et al., 2012)
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	(DE SOUSA; BHOSLE, 2012)
	<i>Kocuria marina</i>	(SARAFIN et al., 2014)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	(PENG et al., 2008)
	<i>Brevibacterium aureum</i>	(KIRAN et al., 2010)
	<i>Myroides</i> sp.	(MANEERAT et al., 2006)
	<i>Alcanivora dieselolei</i>	(QIAO; SHAO, 2010)
Ácidos graxos, fosfolipídeos e ácidos biliares	<i>Myroides</i> sp.	(MANEERAT et al., 2005)
Surfatantes poliméricos	<i>Yarrowia lipolytica</i>	(ZINJARDE; PANT, 2002)
	<i>Pseudomonas nautica</i>	(HUSAIN et al., 1997)

2.6.2 Produção de biossurfatantes pelo gênero *Brevibacterium*

Existem poucos relatos da produção de BS por bactérias do gênero *Brevibacterium*. Kiran et al. (2010) reportaram a produção de brevifactina pela bactéria marinha *Brevibacterium aureum* MSA13 usando óleo de oliva e acrilamida como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente. A brevifactina foi definida como um BS de natureza lipopeptídica capaz de reduzir a tensão superficial da água para 28,6mNm⁻¹. Kiran, Sabu e Selvin (2010) descreveram a produção de um glicolipídeo pela bactéria marinha *Brevibacterium casei* MSA19 empregando glucose

e extrato de carne como fontes de carbono e nitrogênio respectivamente. Esse biossurfatante reduziu a tensão superficial da água para $28,5\text{mNm}^{-1}$. Ferhat et al. (2011) relataram a produção de outro glicolípido por *Brevibacterium* sp. 7G usando hexadecano como fonte de carbono. O BS isolado apresentou uma tensão superficial de $31,2\text{mNm}^{-1}$ e uma CMC de 2000mgL^{-1} .

Recentemente Vilela et al. (2014) descreveram a produção de um lipopeptídeo por *Brevibacterium luteolum* isolada de ambiente marinho, usando vaselina e nitrato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio. O lipopeptídeo demonstrou ser o biossurfatante mais efetivo e eficiente produzido por uma bactéria do gênero *Brevibacterium* reportado até o momento, pois reduz a tensão da água até 27mNm^{-1} com uma CMC de 40mgL^{-1} . Segundo os autores, as propriedades tensoativas desse lipopeptídeo são comparáveis com aquelas da surfactina e os ramnolipídeos.

2.6.3 *Brevibacterium luteolum*

A espécie *Brevibacterium luteolum* foi relatada por primeira vez por Wauters et al. (2003) na identificação de quatro cepas bacterianas isoladas de amostras de origem humana e ambiental. Inicialmente, os autores identificaram a espécie com o nome *Brevibacterium lutescens*, e posteriormente como *B. luteolum* em virtude da coloração amarela das suas colônias (Figura 6b). As células bacterianas têm forma de bastonetes de 2-3 μm de comprimento, são Gram positivas (Figura 6a), não apresentam motilidade, e não formam endósporos, além disso, não apresentam o ciclo bacilo-coco característico de outras espécies do gênero *Brevibacterium*. As colônias são butirosas, amareladas e atingem diâmetro de 1-2mm depois 48h de incubação a 37°C . *B. luteolum* é um microrganismo aeróbico com uma temperatura de crescimento ótimo é entre $30-37^{\circ}\text{C}$, e pode crescer a altas concentrações salinas (até 10% NaCl) (WAUTERS et al., 2003).

A cepa bacteriana empregada neste trabalho foi previamente identificada a nível de espécie como *B. luteolum* através da sua sequência de rRNA 16S (Figura 7). Esta cepa foi isolada no litoral paulista a partir do *Didemnum ligulum* e sua sequência de rRNA 16S foi incluída na base de dados do GenBank através do código JN615454.

Figure 1 consists of two panels. Panel (a) is a micrograph showing Gram-stained bacteria. The bacteria appear as purple-stained cocci, some in chains and some in pairs, against a light background. Panel (b) is a photograph of a petri dish containing a streaked bacterial culture on agar. The colonies are visible as yellowish, elongated streaks across the surface of the agar.

Phylogenetic tree showing the relationships between *Brevibacterium* and *Microbacterium* species. The tree is rooted at the bottom left. Bootstrap values are indicated at the nodes. The scale bar represents 0.01 substitutions per site.

Species and Accession Numbers:

- Brevibacterium sanguinis* DSM15677^T (AJ564859)
- Brevibacterium celere* DSM15453^T (AY228463)
- Brevibacterium casei* DSM20657^T (AJ251418)
- Brevibacterium otitidis* DSM10718^T (AF133534)
- Brevibacterium luteolum* DSM15022^T (AJ488509)
- Isolate AC189a**
- Brevibacterium ravenspurgense* DSM21258^T (EU086793)
- Brevibacterium massiliense* JCM18108^T (EU868814)
- Brevibacterium ptyocampae* DSM21720^T (EU484189)
- Microbacterium schleiferi* DSM20489^T (Y17237)

2.7 Substratos alternativos

33

baixo rendimento obtido quando comparado com meios tradicionais (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999).

Um dos problemas principais na seleção de resíduos como substratos alternativos é encontrar a composição adequada de nutrientes necessários para maximizar tanto o crescimento celular como o rendimento de produção (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999). De acordo com Mercade e Manresa (1994) resíduos agroindustriais contendo altos níveis de carboidratos ou lipídeos e resíduos urbanos suprem as condições para serem usados como fonte de carbono para a produção de biossurfatantes.

Outro fator que afeta a produção de biossurfatantes em substratos alternativos é a dificuldade de padronização do processo devido às variações naturais na composição do substrato, sendo necessário em muitos casos a suplementação de nutrientes além de monitoramento constante, bem como a avaliação dos custos de transporte, armazenagem e tratamento prévio. Além disso, existem dificuldades analíticas e metodológicas na quantificação do produto, sendo necessário o desenvolvimento de metodologias específicas para cada resíduo empregado (MERCADE; MANRESA, 1994). Contudo, a redução dos custos de produção mediante o uso de resíduos pode atingir níveis competitivos em relação aos obtidos pela via petroquímica, ao mesmo tempo que se reduzem os problemas ambientais relacionados ao descarte e custo de tratamento desses resíduos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Na Tabela 4 se apresentam os principais substratos de baixo custo utilizados na produção de biossurfatantes.

Tabela 4 - Principais substratos de baixo custo utilizados na produção de BS.

Substrato	Microrganismo	Biossurfatante	Referência
Glicerol	<i>B. subtilis</i>	Surfactina	(SOUSA et al., 2012)
Glicerol	<i>B. subtilis</i>	Fengicina	(DE FARIA et al., 2011)
Glicerol	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolipídeo	(MOUSSA; MOHAMED; SAMAK, 2014)
Vaselina	<i>B. luteolum</i>	Lipopeptídeo	(VILELA et al., 2014)
Caldo de cana	<i>U. scitaminea</i>	Manosileritritol lipídeos	(MORITA et al., 2011)
Efluente de batata	<i>B. subtilis</i>	Surfactina	(NOAH; BRUHN; BALA, 2005)
Efluente de mandioca	<i>B. subtilis</i>	Lipopeptídeo	(NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004)
Soro de leite	<i>B. licheniformis</i>	Lipopeptídeo	(GOMAA, 2013)
Soapstock (Resíduo do refino de óleo)	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolipídeo	(NITSCHKE et al., 2005)
Óleo de milho	<i>C. bombicola</i>	Soforolipídeo	(PEKIN; VARDAR-SUKAN; KOSARIC, 2005)
Óleo de girassol	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolipídeo	(RIKALOVIC et al., 2012)
Resíduo de gorduras de peixe e de porco	<i>P. antarctica</i>	Manosileritritol lipídeos	(BEDNARSKI et al., 2006)
Resíduo de óleo de canola e de soja	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnolipídeo	(RAZA et al., 2006)
Resíduos de óleo de motor	<i>C. kutscheri</i>	Glicolipídeos	(THAVASI et al., 2007)

2.8 Extração e purificação de biossurfatantes

De acordo com Desai e Banat (1997), a recuperação dos biossurfatantes depende principalmente de sua carga iônica, solubilidade e localização (intracelular, extracelular ou ligado à parede celular). O isolamento de biossurfatantes hidrossolúveis extracelulares geralmente é complexo porque implica várias etapas de concentração enquanto que o isolamento de biossurfatantes associados à paredes celulares ou insolúveis em água é relativamente mais fácil (LIN, 1996).

Geralmente, os compostos intracelulares implicam maiores custos de recuperação, porque antes da purificação as células devem ser lisadas por meios

mecânicos ou enzimáticos, adicionando mais uma etapa ao processo (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

Quando hidrocarbonetos são usados como fonte de carbono, surge a dificuldade de separar o surfatante sem deixar traços de substrato no produto final. Este aspecto é muito importante se o produto for aplicado na indústria de alimentos ou farmacêutica (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

A técnica mais usada para a recuperação de biossurfatantes é a extração com solventes orgânicos como clorofórmio-metanol, diclorometano-metanol, butanol, pentano, hexano, éter, etc (DESAI; BANAT, 1997).

A precipitação com sulfato de amônio é utilizada para a extração de emulsan e biodispersan. A surfactina e outros biossurfatantes carregados produzidos por *Bacillus* podem ser extraídos por precipitação ácida, ajustando o pH do meio para o ponto isoelétrico do composto desejado, enquanto que biossurfatantes de *Pseudomonas sp.* e *Candida tropicalis* são extraídos por precipitação com acetona (MULLIGAN; GIBBS, 1990).

Cromatografia de adsorção em resinas de troca iônica, carvão ativado (HOMMEL et al., 1987a) ou Amberlite XAD-2 (REILING et al., 1986) têm sido usadas para obter produtos de alta pureza. A ultrafiltração também tem sido utilizada para a separação de biossurfatantes do meio de fermentação (LIN; JIANG, 1997; MULLIGAN; GIBBS, 1990).

Finalmente, a obtenção de um produto com elevada pureza é conseguida mediante a combinação de cromatografia de camada fina, filtração em gel e a mais importante, cromatografia de fase reversa (LIN, 1996).

Tabela 5 - Principais processos de recuperação de biossurfatantes.

Processo	Biossurfatante recuperado
Precipitação com sulfato de amônio	Emulsan
	Biodispersan
Precipitação com acetona	Glicolipídeos
Precipitação com acida	Surfactina
Extração com solventes orgânicos	Trealolipídeos
	Soforolipídeos
	Liposan
Cristalização	Glicolipídeos
Centrifugação	Glicolipídeos
Adsorção	Ramnolipídeos
	Lipopeptídeos
	Glicolipídeos
Fracionamento de espuma	Surfactina
Filtração de fluxo tangencial	Mistura de biossurfatantes
Diafiltração e precipitação	Glicolipídeos
Ultrafiltração	Glicolipídeos

Fonte: MAKKAR; CAMEOTRA, 2002

2.9 Otimização mediante ferramentas estatísticas

As limitações na metodologia clássica de otimização do meio de cultura para a produção de biossurfatantes pode ser superada pela aplicação de ferramentas estatísticas (LOTFY; GHANEM; EL-HELOW, 2007). Uma dessas ferramentas de otimização amplamente usadas é a metodologia de superfície de resposta (RSM), que consiste em um conjunto técnicas estatísticas que empregam o planejamento de experimentos para construir modelos, avaliar de forma simultânea os efeitos de diferentes fatores e procurar as condições ótimas de produção (RODRIGUES et al., 2006b). Gu et al. (2005) aplicaram a RSM para otimizar o meio de produção de um lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* MO-01, empregando as concentrações de sacarose, cloreto de amônio e sulfato de zinco como os fatores, obtendo um rendimento similar ao obtido em trabalhos prévios, mas, com o uso de menores quantidades de substrato e menores tempos de produção.

O planejamento experimental para a otimização de uma fermentação é um processo sequencial (HAALAND, 1989). Primeiro se selecionam os fatores contínuos, eliminando os que não são significativos, para obter a mínima quantidade controlável dos mesmos. Segundo, esses fatores remanescentes são otimizados mediante um modelo de superfície de resposta. E finalmente o ponto ótimo predito é verificado (STROBEL; NAKATSUKASA, 1993). Kiran , Sabu e Selvin (2010) e Kiran et al. (2010) aplicaram a RSM para a otimização na produção de biossurfatantes por bactérias marinhas do gênero *Brevibacterium*, selecionando como fatores significativos o tamanho do inóculo e as concentrações de ferro, fonte de carbono e fonte de nitrogênio separadamente, obtendo uma diferença entre 7-8% entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo estatístico.

Existem muitos relatos de otimização da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio baseadas na variação sequencial de um só fator (JOSHI et al., 2007). Estas metodologias além de ser tediosas, levam a resultados errôneos porque não consideram a interação entre os diferentes fatores (HALTRICH; LAUSSAMAYER; STEINER, 1994; HE et al., 2004). Mnif, Chaabouni-Ellouze e Ghribi (2012) obtiveram um aumento de 1,65 vezes na produção de um biossurfatante lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* SPB1, comparado com o método de otimização sequencial de um só fator; usando ensaios Plackett-Burman para a seleção dos fatores significativos e RSM para a otimização desses fatores no meio de produção.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Estudar a produção e recuperação do biossurfatante produzido pela bactéria marinha *Brevibacterium luteolum* e elucidar a estrutura química da molécula tensoativa.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da composição do meio de cultura sobre a produção do biossurfatante.
- Melhorar o rendimento de produção do biossurfatante
- Elucidar a estrutura química do biossurfatante.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do biossurfatante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado, identificado previamente como *Brevibacterium luteolum*, foi isolado à partir de amostras de algas e invertebrados marinhos coletados em 2005 no litoral paulista e mantido no acervo de pesquisa da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP, no âmbito de projeto temático desenvolvido em conjunto com o IQSC (projeto Fapesp 05/60175-2) (MENEZES et al., 2010).

4.2 Meios de cultivo

As placas e os caldos de cultivo para o inóculo foram feitas com:

- Ágar bacteriológico 40g L⁻¹ (somente para meio sólido em placas).
- Caldo marinho Zobell, composição (g L⁻¹): digestão péptica de tecido animal (5); MgCl₂ (8,8); SrCl₂ (0,034); extrato de levedura (1); NaHCO₃ (0,16); KBr (0,08); NaCl (19,45); KCl (0,55); NaF (0,0024); NH₄NO₃ (0,0016); Na₂HPO₄ (0,008); H₃BO₃ (0,022); citrato férrico (0,1); Na₂SO₄ (3,24); CaCl₂ (1,8); Na₂O₃Si (0,004); Na₂SO₄ (3,24).
- Água do mar artificial (ASW), composição (g L⁻¹): KBr (0,1); NaCl (23,48); MgCl₂ (10,61); KCl (0,66); SrCl₂.6H₂O (0,04); Na₂SO₄ (3,92); NaHCO₃ (0,19); H₃BO₃ (0,03); CaCl₂.2H₂O (0,147) ; H₂O destilada 1,0 L (MENEZES et al., 2010).

O meio de produção foi feito com:

- ASW
- Vaselina líquida U.S.P
- NH₄NO₃

O pH dos meios de cultivo foi ajustado para 7,5 ± 0,2.

4.3 Produção de Biossurfatante

O processo de produção do biossurfatante foi padronizado para garantir a reprodutibilidade das análises posteriores.

4.3.1 Padronização do Inóculo bacteriano

As culturas bacterianas mantidas em estoque (freezer a -20°C) foram cultivadas em placas contendo ágar marinho e incubadas em estufa 30°C por 48 horas, esse processo foi repetido uma vez à partir das culturas obtidas. Para a preparação do inóculo, a massa bacteriana foi adicionada em um tubo contendo 5mL de NaCl 0,86% (solução salina) e se ajustou a densidade óptica em 0,5 ($D.O \approx 5 \times 10^8$ UFC/mL) com ajuda do espectrofotômetro (Spectronic Genesys 10 - Thermo Scientific) em 610nm. Uma alíquota de 1mL desta suspensão foi adicionada em um erlenmeyer de 250mL contendo 50mL do caldo marinho (preparado em ASW), incubando-se a 30°C e 150rpm em agitador tipo shaker (Shaker empilhável MaxQ 6000 Thermo Scientific) durante 18h, condições nas quais o crescimento bacteriano encontra-se no final da fase logarítmica (VILELA, 2014).

4.3.2 Condições de partida para a produção de biosurfatante

Para a produção do BS inicialmente utilizou-se metodologia descrita por Vilela (2014). Adicionou-se 8mL do inóculo bacteriano padronizado em um erlenmeyer de 500mL contendo 92mL de ASW, 0,5% de NH_4NO_3 como a fonte de nitrogênio e 2% de vaselina como fonte de carbono incubando-se a 30°C e 150rpm (Shaker empilhável MaxQ 6000 Thermo Scientific) durante 120h. O pH do meio foi ajustado previamente para $7,5 \pm 0,2$.

Posteriormente, o meio foi submetido a centrifugação à $12.000 \times g$ (centrifuga refrigerada Sorvall Legend RT Thermo Scientific) por 30 min e o sobrenadante livre de células foi coletado para a extração do produto.

4.4 Extração do biotensoativo:

Nessa etapa foram testadas 2 metodologias que são descritas a seguir.

4.4.1 Precipitação ácida

O pH do sobrenadante livre de células, foi ajustado para 2,0 através da adição de H_2SO_4 concentrado e mantido a 4°C por 24 h. O precipitado obtido foi separado após centrifugação $12.000g$ por 30 min e mantido em estufa para secagem a 50°C por 12 horas (HEYD et al., 2008). O produto obtido foi referido como BS bruto 1 (BSb1).

Figura 8 - Esquema global da metodologia.

4.4.2 Extração com resina de adsorção

Como método alternativo para a extração do biotensor empregou-se a adsorção sob resina de adsorção Amberlite XAD-2 (SIGMA-ALDRICH).

Previamente ao processo de extração a resina foi lavada com metanol de acordo com as especificações do fabricante: 300g de resina em volume igual de

metanol por 15min sob agitação a 150rpm, depois filtrou-se com funil de Buchner para retirada do metanol. Em seguida fez-se o mesmo, porém usando tampão fosfato 0,1M pH 6,1. Depois desta lavagem prévia, incubou-se a resina com o sobrenadante livre de células obtido no processo de produção à 37°C durante 12h à 150rpm. O sobrenadante foi retirado com filtração em funil de Buchner e lavou-se a resina três vezes com volumes iguais de água destilada. O biotensoativo foi recuperado deixando a resina com um volume igual de metanol por 15min à 150rpm, depois a resina foi filtrada em funil de Buchner e o sobrenadante foi conservado para a etapa posterior. Repetiu-se esta recuperação mais uma vez para obter duas frações que foram submetidas a evaporação sob vácuo (rotaevaporador Fisatom 801) separadamente até obter-se dois produtos sólidos. Finalmente, colocou-se os produtos na estufa à 50°C por 12h. O produto obtido na primeira recuperação foi denominado BS bruto 2 (BSb2) e o produto obtido na segunda recuperação foi denominado BS bruto 3 (BSb3) (ver Figura 8).

4.5 Determinação das propriedades tensoativas:

Uma solução aquosa 0,1% p/v de cada um dos BS brutos obtidos nas metodologias de extração foi usada para as medidas de tensão superficial (TS), CMD^{-1} e CMD^{-2} utilizando um tensiômetro microprocessado (Sigma 700 - Attension) a 25°C pelo método do anel de Du Nouy (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998). As medidas de diluição micelar crítica (CMD) consistem em diluições 10x (CMD^{-1}) e 100x (CMD^{-2}) das soluções de BS, para uma determinação qualitativa da quantidade de tensoativo produzido.

4.6 Melhoramento da produção usando o planejamento de experimentos:

4.6.1 Triagem dos fatores significativos

A escolha dos fatores a serem estudados foi baseada nos dados de literatura. Os três fatores escolhidos como significativos para a produção do biossurfatante foram: a concentração da fonte de carbono (vaselina), a concentração da fonte de nitrogênio (NH_4NO_3) e a concentração de água do mar artificial (ASW).

4.6.2 Planejamento fatorial

Uma vez feita a triagem dos fatores, estabeleceu-se um planejamento fatorial 2^3 completo para a produção do BSb3, contendo 8 experimentos e 2 réplicas autênticas do ponto central. Nas Tabelas 6 e 7 apresentam-se a codificação dos fatores por níveis e a matriz de planejamento respectivamente. Os experimentos foram realizados seguindo as metodologias de produção e extração de BS descritas nos itens 4.3 e 4.4, usando 600mL de meio de produção para cada um deles.

Tabela 6 - Codificação a dois níveis dos potenciais fatores significativos na produção de biossurfatante.

Fator	Níveis	
	-1	1
Concentração da fonte de carbono (C)	2%	4%
Concentração da fonte de nitrogênio (N)	0,5%	2%
Concentração de água do mar artificial (ASW)	20%	100%

Tabela 7 - Planejamento fatorial 2^3 com duas réplicas do ponto central.

Experimento ^a	Aleatório ^a	C (%)	N (%)	ASW (%)	C	N	ASW
1	2	2	0,5	20	-1	-1	-1
2	3	4	0,5	20	1	-1	-1
3	9	2	2	20	-1	1	-1
4	5	4	2	20	1	1	-1
5	7	2	0,5	100	-1	-1	1
6	10	4	0,5	100	1	-1	1
7	8	2	2	100	-1	1	1
8	4	4	2	100	1	1	1
9	1	3	1 ^b	60	0	-0,33 ^b	0
10	6	3	1 ^b	60	0	-0,33 ^b	0

^a. A coluna experimento e a coluna aleatório indicam o ordem estabelecida pelo modelo estatístico e a ordem para a execução dos experimentos, respectivamente.

^b. 1% não corresponde ao nível intermediário entre os níveis superior e inferior da concentração de nitrogênio, mas foi escolhido convenientemente para ser usado na análise da relação C/N.

Os rendimentos (em massa) e a atividade tensoativa dos BSb3 obtidos, foram utilizados como respostas. Esses resultados foram analisados usando o software

STATÍSTICA 12, obtendo-se a análise de variância (ANOVA), a significância dos fatores e a superfície de resposta.

Os valores dos fatores que maximizaram a produção de biossurfatante foram usados para a obtenção da massa total de BSb3 (ver Figura 8) que foi usado nas etapas posteriores.

Os resultados do planejamento fatorial também foram empregados para analisar o efeito da relação C/N na produção de biossurfatante. Usaram-se valores inteiros para a variável composta C/N e se ajustou a 1% o nível intermediário da fonte de nitrogênio no planejamento para cumprir essa convenção (Ver Tabela 7). Os experimentos 9 e 10 continuaram sendo denominados “pontos centrais”, embora não sejam estritamente centrais.

4.7 Semipurificação do biossurfatante

4.7.1 Lavagem do BSb3 com clorofórmio

A massa total de BSb3 foi adicionada de 10mL de clorofórmio agitando-se levemente por alguns segundos e após retirou-se o solvente por decantação. A fração não solúvel em clorofórmio foi seca em estufa (50°C por 24h) e a fração solúvel em clorofórmio foi evaporada e posteriormente seca em estufa (50°C por 24hs). A presença de BS em ambas frações foi determinada pela medida da tensão superficial pelo método do anel de Du Nouy utilizando um tensiômetro microprocessado (Sigma 700 - Attension) a 25°C (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998). A fração com o maior conteúdo de BS foi referida como o BS semi-purificado (BSs-p) (ver Figura 8).

4.8 Purificação do biossurfatante

4.8.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Uma pequena quantidade do BSs-p foi dissolvida em metanol e foi aplicada com ajuda de um tubo capilar sobre uma cromatoplaca de sílica gel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254). A fase móvel empregada na corrida foi clorofórmio/metanol/acido acético (25:24:1) (QAZI et al., 2014).

Ao final da corrida, os spots foram revelados pulverizando uma solução contendo ninhidrina (0,1% em etanol) sob a cromatoplaça, aquecendo-se em estufa a 100°C por 5 minutos.

4.8.2 Análise ultravioleta-visível (UV-vis) do BSb3

Avaliou-se o comprimento de onda de absorção máxima UV-vis do BSs-p, com a finalidade de ter um critério de isolamento do biossurfatante na separação cromatográfica. Amostra de 5,0mg do BSs-p foram dissolvidas em 20 mL de metanol/clorofórmio (1:1) e com esta solução fez-se uma varredura na região entre 200-500nm (espectrofotômetro Genesys 10 scanning UV de Thermo Scientific).

4.8.3 Separação cromatográfica do BS

Uma amostra de 1000mg do BSs-p foi dissolvida em 400mL de metanol/clorofórmio (1:1) e injetada em frações de 20mL em separador automático (Sepacore Flash BUCHI) com coluna de sílica de 10cm. Empregou-se uma gradiente de eluição de 25-50% de metanol em clorofórmio. Os comprimentos de onda de trabalho do detector UV no equipamento foram ajustados de acordo com o padrão de absorbância UV-vis do BSb3. Frações de 15 mL foram coletadas durante 28min.

4.8.4 Detecção de aminoácidos nas frações coletadas

Alíquotas de 1mL de cada fração coletada na separação cromatográfica foram adicionadas de 1mL de ninhidrina (0,1% em etanol) em tubos de ensaio. As misturas foram aquecidas a 100°C em banho-maria por 10 minutos. A reação entre os agrupamentos amino e a ninhidrina produz um derivado de cor roxa que foi detectado pelo seu máximo de absorbância a 512nm (espectrofotômetro Genesys 10 scanning UV de Thermo Scientific) nas frações coletadas.

A presença de aminoácidos nas frações coletadas também foi analisada por CCD seguindo a metodologia descrita no item 4.8.1.

4.8.5 Atividade tensoativa do BS purificado

A fração contendo aminoácidos foi evaporada (rotaevaporador Fisatom 801) e levada a secagem a 50°C por 12h. O sólido obtido foi referido como BS purificado (BSp) (ver Figura 8). Uma solução 0,1% p/v do BSp foi usada para a medida de tensão superficial (TS) segundo metodologia descrita no item 4.5.

4.9 Caracterização química do BS:

4.9.1 Proteína total

A determinação da porcentagem de proteína total do BSb3 e o BSp foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951). A solução de Lowry foi preparada (o mesmo dia de uso) misturando 50mL da solução A/ 0,5mL da solução B/ 0,5mL da solução C.

Solução A: pesaram-se 2,80g de NaOH e 14,3083g de Na_2CO_3 e levou-se o volume até 500mL com água destilada em balão volumétrico.

Solução B: pesou-se 1,4238g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e levou-se o volume até 100mL com água destilada em balão volumétrico.

Solução C: pesou-se 2,8598g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e levou-se o volume até 100mL com água destilada em balão volumétrico.

O reagente de Folin foi preparado misturando 5mL do Folin-Ciocalteu Phenol TS com 6mL de água destilada em frasco âmbar. Esta mistura foi feita 5 minutos antes de ser usada devido a sua alta fotosensibilidade.

Soluções contendo 20, 40, 60, 80 e 100mg/L de proteína foram preparados a partir de um padrão de albumina bovina de 40g/L. Amostras de 10,5mg do BSb3 e 11,1mg do BSp foram usados para preparar soluções problema em 10mL de água destilada.

1mL de cada solução (padrões e amostras) foram adicionados de 5mL de solução de Lowry mantendo-se por 20minutos no escuro. Após esse tempo, adicionou-se 0,5mL do reagente de Folin em cada tubo deixando-se 30minutos no escuro. Transcorrido esse tempo, mediu-se a absorbância de cada solução a 660nm (espectrofotômetro Genesys 10 scanning UV de Thermo Scientific). Determinou-se o conteúdo de proteína total nas soluções problema a partir da curva padrão e a absorbância das soluções problema.

4.9.2 Análise de aminoácidos por cromatografia em papel

Amostras de 20mg do BSb3 e 20mg do BSp foram dissolvidos por separado em 2mL de uma solução aquosa de HCl 6M mantendo-se a 110°C durante 18h. Uma pequena quantidade de cada um foi aplicada sobre uma tira de papel filtro com

ajuda de um capilar de vidro. A fase móvel empregada na corrida foi n-butanol/água/ácido acético (4:1:1).

Ao final das corridas, os spots foram revelados pulverizando uma solução 0,1% de ninhidrina em etanol sob as tiras de papel, aquecendo-se em estufa a 100°C por 5 minutos.

Soluções padrão de prolina, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, histidina, alanina, serina, glicina, fenilalanina, valina e leucina foram empregadas para a identificação de aminoácidos.

4.9.3 Análise estrutural

4.9.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

O BSb3 e o BSp foram analisados por espectroscopia de Infravermelho utilizando-se um espectrofotômetro Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Marca/modelo: Shimadzu/IRAffinity 1. Cada espectro foi obtido com uma resolução de 4cm⁻¹ na faixa de 500 – 4500cm⁻¹ e 32 scans. As amostras sólidas foram analisadas sob pastilhas de KBr feitas com pastilhador de parafuso.

4.9.3.2 Análise de metil ésteres de ácidos graxos (FAME)

Amostras de 10mg do BSb3 e 10mg do BSp foram tratados separadamente com 1mL de metanol e 1gota de ácido sulfúrico concentrado, e mantidos sob agitação a 60°C por 30 minutos (metanólise). Após os 30 minutos deixou-se esfriar a solução até temperatura ambiente e adicionaram-se 2mL de cloreto de sódio e 1mL de n-hexano, a solução foi agitada e deixada em repouso até separação das fases. A fase orgânica foi separada e coletada em frasco amostrador para ser analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

O cromatógrafo a gás utilizado foi o GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), acoplado a um espectrômetro de massas QP3010 Plus equipado com um auto-injetor Shimadzu modelo AOC-20i+s. As condições utilizadas foram: coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5Ms (5% fenilmetilpolisiloxano) com 30m x 0,25mm d. i., com 0,25 µm de espessura de fase, fluxo de 0,94 mL/min, utilizando hélio como gás de arraste (99,999%). A temperatura foi programada mantendo 100°C por 1 min, seguido de um aumento de 10°C/min até atingir 300°C, seguido de

isoterma por 29 min, à fim de limpar completamente a coluna; temperatura do injetor de 250°C e temperatura do detector (ou interface) de 270°C; foi injetado um volume de 1 µL em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:10 e pressão na coluna de 67,9kPa. As condições do EM foram detector de íons do tipo quadrupolo operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1666; intervalo de varredura de 0,30 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

4.9.3.3 Análise do BS por espectrometria de massa

O BSb3 foi dissolvido em uma mistura de acetonitrila/água (1:1 v.v⁻¹) + 0,01% de ácido fórmico e injetado em um espectrômetro de massa de alta resolução LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific) equipado com interface de ionização por electrospray (ESI). O BSb3 foi ionizado operando no modo positivo. Os scans foram feitos na faixa de 105,00-1300,00 *m/z*. A fragmentação dos íons moleculares foi feita por dissociação induzida por colisão (28-30eV).

4.10 Atividade antimicrobiana

Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) do BSb3 e do BSp frente as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19112) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25179). As cepas foram obtidas a partir de uma coleção de culturas padrão (ATCC – American Type Culture Collection) fornecidas pelo Laboratório de Referência do Instituto Oswaldo Cruz (INCQS – FIOCRUZ).

4.10.1 Meios de cultura

- Placas com ágar extrato de levedura triptona de soja (TSYEA), composição (g L⁻¹): digestão pancreática de caseína (15), digestão papáica de farinha de soja (5), extrato de levedura (6), NaCl (5), agar (15). pH: 7,3 ± 0,2.

- Caldo extrato de levedura triptona de soja TSYEB, composição (g L⁻¹): digestão pancreática de caseína (17), digestão papáica de farinha de soja (3), extrato de levedura (6), NaCl (5), dextrose (2,5), K₂PO₄ (2,5). pH: 7,3 ± 0,2. Empregado para o cultivo de *L. monocytogenes* (ATCC 19112) e *S. mutans* (ATCC 25179).

- Caldo Müeller Hinton, composição (g L⁻¹): infusão de carne (300), hidrolisado ácido de caseína (17.50), amido (1.50). pH 7.4 ± 0.2. Empregado para o cultivo de *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. enteritidis* (ATCC 13076)

4.10.2 Inóculo

A partir dos estoques bacterianos a -20°C semeou-se uma placa de meio TSYEA para cada uma das bactérias testadas, incubando-se a 37°C por 24 h. O processo foi repetido mais uma vez para garantir a viabilidade e pureza das culturas. Uma pequena porção bacteriana de cada placa foi adicionada em solução salina (NaCl 0,86%) e a concentração de células foi ajustada aproximadamente em 1,5x10⁸ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônias por mL) usando a escala 0,5 de McFarland (1 mL de cloreto de bário (BaCl₂) a 1% + 99 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1%). Uma vez ajustadas as suspensões ao padrão de McFarland, foram diluídas 1:10 com solução salina para obter população de aproximadamente 1,5x10⁷ UFC mL⁻¹ (CLSI, 2005).

4.10.3 Solução de biossurfatante

As soluções estoque do BSb3 e o BSp foram preparadas, inicialmente na concentração de 4000 µg mL⁻¹ e esterilizadas por filtração em filtro de 0,22 µm.

4.10.4 Técnica empregada

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo segundo metodologia estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI M7-A6 2005. 100µL do meio de cultura correspondente de cada bactéria foram adicionados nas cavidades de 5 placas de microdiluição de 96 cavidades (uma placa para cada bactéria). Todas as placas de microdiluição foram divididas para trabalhar com o BSb3 entre as fileiras A-D e com o BSp entre as fileiras E-H. 100µL das soluções estoque de biossurfatante foram adicionados na coluna 1 obtendo-se uma concentração de 2000ppm de cada produto em cada cavidade desta coluna. Diluições progressivas (2x) da coluna 1 foram feitas tirando 100µL do volume de cada coluna para ser adicionados na coluna seguinte iniciando na coluna 1 e terminando na coluna 10 na qual, descartaram-se 100µL para conservar a uniformidade volumétrica de todas as cavidades. Desta forma trabalhou-se em uma faixa de concentração de cada BS de 2000-3,91 ppm. A

coluna 11 foi usada como controle positivo de crescimento contendo o caldo de cultura e o inóculo bacteriano. A coluna 12 foi usada como controle negativo do crescimento contendo o caldo de cultura de A-D, solução do BSb3 em E e F e solução do BSp em G e H.

Nas colunas 1 a 11 foram adicionados 20µL do inóculo correspondente a cada placa e foram deixadas em incubação a 37°C por 24h.

4.10.5 Leitura

Apos o período de incubação das placas, adicionaram-se 20µL do corante brometo de tetrazólio (MTT – 1 mg mL⁻¹) em todas as cavidades. O MTT manifesta uma mudança de cor do amarelo para o roxo em resposta a atividade metabólica bacteriana indicando a presença de crescimento bacteriano. A CIM foi reportada como a menor concentração na qual as soluções de biossurfatante inibiram o crescimento bacteriano com respeito ao controle positivo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção e extração do biossurfatante

O principal problema na produção de biossurfatante por *Brevibacterium luteolum* nas condições de partida foi o baixo acúmulo de produto, manifestado por tensões superficiais acima de 30mNm^{-1} , tanto, no meio de produção sem células como nos BS brutos obtidos por precipitação ácida e adsorção (Tabela 8).

Tabela 8 - Produção e extração do biossurfatante nas condições de partida.

Processo	Tensão superficial (mNm^{-1})	CMD ⁻¹ (mNm^{-1})	CMD ⁻² (mNm^{-1})	Massa (mg)
Produção de BS				
Meio de produção inoculado t=0.	56,5	--	--	--
Meio de produção sem células t=120hrs.	49,7	70,7	72,0	--
Extração do BS				
• BSb1	63,4	72,0	--	40,4
• BSb2	64,3	72,0	--	45,5
• BSb3	35,6	46,6	71,3	26,4

Os métodos de extração foram avaliados de acordo à quantidade relativa de biossurfatante extraída do meio de produção, determinada qualitativamente pela atividade tensoativa em solução aquosa de cada BS bruto. Entre os BS brutos aquele com maior atividade tensoativa em solução aquosa foi o BSb3 ($35,6\text{mNm}^{-1}$) o qual foi extraído por adsorção. Portanto, no caso particular do biossurfatante produzido por *Brevibacterium luteolum* a extração com resina Amberlite XAD-2 foi mais efetiva na recuperação do BS, comparada com a precipitação ácida e foi o método escolhido para a continuidade do trabalho.

A XAD-2 é uma resina de adsorção polimérica hidrofóbica que interage de forma não seletiva com os compostos hidrofóbicos presentes no meio de produção incluindo o domínio apolar dos biossurfatantes (ROSLER; GOODWIN, 1984). A diferença entre a capacidade tensoativa do BSb2 ($64,3\text{mNm}^{-1}$) e BSb3 ($35,6\text{mNm}^{-1}$) é uma clara evidencia de que o biossurfatante fixou-se na resina com grau

significativo de retenção ocasionando menor saída de BS na primeira lavagem da resina com metanol (no BSb2), em relação a segunda lavagem (no BSb3).

O uso da adsorção e a extração com solventes orgânicos como métodos de recuperação de BS representa um impacto ambiental toda vez que solventes tóxicos são empregados. Certamente, para algumas aplicações, tais como, a biorremediação o uso direto do microrganismo produtor do BS ou o meio de produção sem células é uma estratégia efetiva, para as quais não é necessária a caracterização estrutural dos compostos ativos. O uso direto do meio de produção sem células apresenta a vantagem adicional do que o BS é geralmente muito estável e efetivo no meio que foi empregado para sua biossíntese (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). No entanto, no caso do BS produzido por *B. luteolum* o meio de produção sem células não apresentou quantidade significativa de BS indicado pela elevada tensão superficial, descartando assim a ideia de que possa ser usado diretamente em aplicações comerciais e fazendo necessário o uso de metodologias efetivas de recuperação do BS como a adsorção com resina. Uma estratégia proposta para reduzir o impacto ambiental do uso de metanol na recuperação com resina consiste na recuperação e reutilização do solvente.

Embora, o maior conteúdo de BS foi observado no BSb3, seu CMD^{-1} ($46,6mNm^{-1}$) e CMD^{-2} ($71,3mNm^{-1}$) foram evidência de que o conteúdo de BS era baixo e a massa produzida (26,4mg) foi muito pequena para ser usada nas etapas posteriores. Assim, a próxima etapa no estudo da produção do BS foi ajustar as condições de produção através do planejamento de experimentos visando obter maior acúmulo de BS no meio.

5.2 Melhoramento da produção usando o planejamento de experimentos:

Na Tabela 9 são mostrados os rendimentos em massa e as tensões superficiais dos BSb2 e dos BSb3 obtidos em cada experimento do planejamento fatorial. Observa-se que a massa de produto obtida nos pontos centrais (experimentos 9 e 10 na Tabela 9) não foram reprodutíveis portanto utilizou-se como resposta o valor de tensão superficial.

Observa-se que o teor de BS foi maior no BSb3 com respeito ao BSb2 em todos os experimentos, fato que já foi discutido anteriormente, e evidenciado pelos

valores de tensão superficial (Tabela 9). Com base nessa observação, escolheu-se a tensão superficial do BSb3 como a resposta, mais consistente, ao objetivo de melhorar a produção de BS com ajuda do planejamento fatorial.

Tabela 9 - Rendimentos em massa e tensões superficiais do BSb2 e o BSb3 obtidos no planejamento fatorial.

Experimento	Massa (mg)	TS (mNm ⁻¹) ^a	Massa (mg)	TS (mNm ⁻¹) ^a
	BSb2	BSb2	BSb3	BSb3
1	42,8	41,810	13,6	31,130
2	41,9	44,875	24,1	30,235
3	47,4	46,406	46,9	29,887
4	53,0	43,572	35,0	27,697
5	45,5	61,268	26,4	35,540
6	91,1	50,895	54,4	29,811
7	59,3	64,020	41,1	46,108
8	84,5	45,560	22,9	31,476
9	48,9	42,670	21,7	29,402
10	57,8	41,285	40,0	28,789

^aTensão superficial de uma solução 0,1% do BS bruto.

No diagrama de Pareto observa-se que os fatores significativos que afetaram a produção de BS foram: a concentração de água do mar ASW, e concentração da fonte de carbono no meio de produção. As interações entre a concentração da fonte de carbono e ASW, e entre a concentração da fonte de nitrogênio e ASW também foram significativas (Figura 9).

Figura 9 - Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 (as barras que ultrapassam a linha vertical vermelha indicam fatores significativos, com 95% de confiança).

Utilizando os dois fatores significativos foram geradas superfícies de resposta e gráficos de contorno para cada nível testado da fonte de nitrogênio (Figura 10). Nessas três superfícies de resposta observou-se que a tensão superficial tende ao mínimo quando aumentou-se a concentração de carbono e diminuiu-se a concentração de ASW. Essa observação evidencia um efeito desfavorável da concentração de ASW sob a produção de BS, e ao mesmo tempo, o efeito favorável da concentração de carbono para este processo. Adicionalmente, a maior inclinação das superfícies de resposta ao passar de um nível inferior para um nível superior da concentração de nitrogênio estabelece que o efeito dos fatores significativos é mais marcante, quando se aumenta a concentração de nitrogênio.

Figura 10 - Superfícies de resposta e gráficos de contorno relativos às concentrações de carbono e de ASW frente às diferentes concentrações de nitrogênio testadas: a) 0,5%N b) 1%N e c) 2%N.

A maioria dos trabalhos publicados referentes a aplicação do planejamento fatorial para o melhoramento da produção de BS utilizam como fatores a concentração da fonte de carbono, a concentração da fonte de nitrogênio e a concentração de alguns íons como ferro, fosfato e zinco no meio de produção (GU et al., 2005; KIRAN et al., 2010; LIU et al., 2012; MNIF; CHAABOUNI-ELLOUZE; GHRIBI, 2012), devido ao fato de que estas são as variáveis nutricionais que mais influenciam a produção de BS (AL-ARAJI et al., 2007). No entanto, poucos trabalhos relataram o uso da concentração de água do mar (%ASW) como um fator para o planejamento fatorial. Ghribi et al. (2011) otimizaram a produção de BS por *Bacillus subtilis* empregando as concentrações de soja, cascas de laranja, e água do mar como os fatores. Segundo os autores, o rendimento máximo de produção do BS foi obtido usando 10g/L de soja, 15,5g/L de cascas de laranja e 30% de água do mar. Neste trabalho, a vantagem de usar o %ASW como um dos fatores foi que esta variável levou em conta a variação simultânea de todos os micronutrientes presentes na água de mar, reduzindo assim, o número de experimentos no planejamento fatorial comparado com a situação onde cada micronutriente é avaliado separadamente.

Embora, a produção do BS tenha sido melhorada utilizando-se uma concentração de ASW menor de 100% (devido ao efeito negativo da ASW), isso não indica que sua capacidade tensoativa se reduza significativamente ao ser usado em ambientes com concentrações salinas superiores, como por exemplo em aplicações como a bioremediação de ambientes marinhos ou em formulações industriais com altas concentrações de sal. De acordo com Vilela et al. (2014) o BS produzido por *B. luteolum* conserva sua atividade tensoativa em concentrações salinas entre 16-20% de NaCl. A diluição da água do mar, provavelmente, forneceu balanço de minerais no meio de cultura que favoreceu a biossíntese do BS.

A relação entre a concentração de carbono e de nitrogênio (C/N) do meio foi um parâmetro importante para estudar o efeito relativo da fonte de nitrogênio na produção de biossurfatante. Na Figura 11 observa-se a variação da tensão superficial em função de razão C/N e da concentração de ASW (codificada a 3 níveis). O gráfico de contorno apresenta uma região próxima de C/N=9 e ASW=0 (em verde escuro) onde aparentemente as tensões superficiais atingem os valores

mínimos, mas essa região não contém pontos experimentais e, portanto, não se pode afirmar categoricamente que tal região foi estimada corretamente. O ponto mínimo experimental identificado como #4 na superfície corresponde a uma relação C/N de 2 e uma concentração de ASW de 20% (nível -1 na Figura 11). A região ao redor do mínimo #4 contém outros pontos experimentais onde as tensões são menores do que 30 mNm^{-1} , o que sugere que é provável que o verdadeiro mínimo global da superfície possa estar contido nessa região. O fato de que essa região do mínimo esteja localizada em valores baixos de C/N (entre 1 e 3) sugere que a produção de BS pode ser maximizada sem limitação da fonte de nitrogênio.

Kiran et al. (2010) relataram que a relação C/N de 0,5 (2% de acrilamida/ 1% de azeite de oliva) promoveu a produção máxima de BS por *Brevibacterium aureum*, indicando que o BS, além de ser produzido sem limitação de nitrogênio (como observado neste estudo), foi sintetizado em maior quantidade em concentração de nitrogênio maior do que a de carbono.

Figura 11 - Superfície de resposta e gráfico de contorno relativos à razão C/N e à concentração de ASW.

O uso do planejamento fatorial foi útil para avaliar os efeitos de cada um dos três fatores nutricionais (e suas interações) no processo de produção do biossurfatante, e também para indicar os valores desses fatores que permitem obter o maior acúmulo de BS dentro das faixas estudadas. O acúmulo de BS manifestou-se não pelo rendimento em massa (1,3 vezes superior com respeito a massa obtida

nas condições iniciais), mas pelos valores de tensão superficial; em outras palavras, o BSb3 obtido no experimento #4 não correspondeu ao produto de maior massa, mas sim ao produto com maior teor de BS por unidade de massa. A partir destes resultados, a produção de biossurfatante para os ensaios posteriores foi realizada utilizando-se 2% de fonte de nitrogênio, 4% de fonte de carbono e 20% de ASW. Foram empregados 9600mL de meio de produção para obter 2,193g do BSb3. Esta massa total de BSb3 foi utilizada subsequentemente nas etapas de purificação e caracterização do BS.

5.3 Semi-purificação do biossurfatante

Após extração do BSb3 com clorofórmio e secagem em estufa, foram obtidos dois sólidos: um insolúvel em clorofórmio e outro solúvel em clorofórmio. As tensões superficiais das soluções aquosas (0,1%) do sólido insolúvel e do sólido solúvel foram 35 mNm^{-1} e 26 mNm^{-1} , respectivamente, o que sugere que grande parte do BS foi extraído pelo clorofórmio e assim, concentrado no segundo sólido, motivo pelo qual este foi referido como BS semi-purificado ou BSs-p. A solubilidade do BS, tanto em metanol, como em clorofórmio era esperada devido à natureza anfipática deste tipo de compostos. O processo de extração permitiu então a obtenção de um BS semi-purificado com maior concentração de BS e menor concentração de impurezas não solúveis em clorofórmio comparado com o BSb3.

5.4 Purificação do biossurfatante

5.4.1 Cromatografia de Camada Delgada

Na análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) do BSs-p confirmou-se a presença de aminoácidos, mediante a observação de uma mancha ($R_f = 0,91$), após revelação com ninhidrina, assim como, observado por Vilela (2014). De acordo com isso, o BS produzido por *B. luteolum* deve ser também um lipopeptídeo, sem afirmar que corresponda ao mesmo composto, dado que a composição do meio de produção usada nos dois trabalhos foi diferente.

Figura 12 - Ilustração da cromatoplaça do BSs-p produzido por *B. luteolum*. A mancha de cor roxa com $R_f = 0,91$ refere-se ao resultado positivo para aminoácidos.

5.4.2 Análise ultravioleta-visível (UV-vis) do BSs-p

No espectro ultravioleta-visível do BSs-p observou-se uma absorbância significativa em 234nm e absorbâncias de pouca intensidade em 206, 220 e 258nm (Figura 13). Apesar da absorbância em 206nm e 220nm apresentarem baixa intensidade estes comprimentos de onda são comumente encontrados nos espectros UV de proteínas, associados a absorção da ligação peptídica (ZAIA; THAÏS; ZAIA, 1998) e portanto estes comprimentos de onda foram também selecionadas visando a separação do BS.

Figura 13 - Espectro de varredura na região Ultravioleta-visível do BSs-p produzido por *B. luteolum*.

5.4.3 Separação cromatográfica do BS.

120 frações cromatográficas foram coletadas em tubos de ensaio como resultado da eluição do BS em coluna de sílica no separador automático. No cromatograma obtido observaram-se picos de absorção em 234, 206, 220 e 258nm entre as frações 4-7 e as frações 18 e 19. Os picos de absorção das frações 4-7 foram os mais altos (Figura 14) indicando que, provavelmente, a maior concentração de BS encontrava-se entre essas frações em cada corrida cromatográfica.

Figura 14 - Cromatograma do BSs-p produzido por *B. luteolum* obtido no separador automático. As linhas roxa, azul, cinza e verde escura correspondem à absorbância UV a 234nm, 206, 220 e 258nm respectivamente. A linha verde clara indica o gradiente crescente de metanol.

5.4.4 Detecção de aminoácidos nas frações coletadas

O espectro de varredura UV-vis das frações cromatográficas derivatizadas com ninhidrina amostrou que o conteúdo de aminoácidos do BSb3 concentrou-se principalmente nas frações 7 e 8 (Figura 15), enquanto, as frações 18 e 19 não apresentaram conteúdo de aminoácidos detectável pelo método usado.

Figura 15 - Espectros de varredura ultravioleta-visível das frações cromatográficas derivatizadas com ninhidrina. Os picos de absorção em 512nm indicam a presença de aminoácidos nas frações 7 e 8.

Adicionalmente, a análise por CCD das frações cromatográficas indicou a presença exclusiva de aminoácidos na fração 7 através da visualização de uma mancha com um R_f de 0,90, muito similar a aquela observada na cromatoplaça do BSs-p.

Finalmente, uma massa de 401,4mg de BSp foi obtida apos a rota-evaporação e secagem das frações 7 e 8.

5.4.5 Atividade tensoativa do BSp

A tensão superficial da solução 0,1% do BSp em água foi $48,1\text{mNm}^{-1}$ evidenciando, que contrário ao esperado, o BSp contém menor concentração de BS que o BSb3. Essa perda de BS provavelmente ocorreu durante a separação cromatográfica, devido a presença de concentrações muito baixas de BS nas frações descartadas, que não foram detectadas por derivatização com ninhidrina. É provável que as principais perdas de BS se deram a volta das frações 7 e 8, como por exemplo nas frações 4 e 5 onde registrou-se absorção de baixa intensidade a 206 e 220nm.

A perda indesejável de BS sugere a necessidade de refinar o método de purificação. No entanto, o baixo rendimento em massa na produção de BS e o uso de quantidade considerável de amostra para a medição da tensão superficial (mínimo 10mg por medida) são fatores que limitam o processo de purificação, sendo necessário continuar com planejamento fatorial na busca de otimizar o processo ou, o uso de um método de detecção da atividade tensoativa que utilize uma menor quantidade da amostra.

5.5 Caracterização química do BS:

5.5.1 Proteínas totais

Verificou-se alta linearidade para a curva padrão obtida pelo método de Lowry, na faixa de concentrações testadas. As absorbâncias do BSb3 e o BSp foram de 0,433 e 0,432, correspondentes a porcentagens de proteína total de 5% e 3,5%, respectivamente.

O conteúdo menor de proteína no BSp foi outra evidencia da perda de BS na separação cromatográfica.

Figura 16 - Curva padrão obtida pelo método de Lowry para a quantificação de proteínas totais.

5.5.2 Análise de aminoácidos por cromatografia em papel

Observou-se uma mancha de cor amarela com fator de retenção de 0,54 para o BSb3 e 0,56 para o BSp, indicando claramente a presença de prolina em ambos

(Figura 17). Embora, não tenha sido possível identificar outros tipos de aminoácidos por cromatografia de papel, o fato de saber que a prolina pode ser parte da estrutura do BS foi muito útil na sua caracterização estrutural por espectrometria de massa (item 5.5.3.3).

Figura 17 - Ilustração da cromatografia de papel da análise de aminoácidos do BS produzido por *B. luteolum*. a) Mancha da prolina ($R_f = 0,54$), b) mancha do BSb3 ($R_f = 0,54$) e c) mancha do BSp ($R_f = 0,56$).

a) b) c)

5.5.3 Análise estrutural

5.5.3.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

O espectro infravermelho do BSb3 e do BSp apresentaram as mesmas bandas de absorção (Figura 18) indicando assim que ambos contêm o mesmo tipo de compostos. A larga banda da esquerda do espectro com um máximo de absorbância a 3163cm^{-1} e um ombro a 3400cm^{-1} correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico da ligação N-H, respectivamente, indicando a presença de grupos amino. Em 1649cm^{-1} e 1398cm^{-1} observam-se duas bandas que podem ser associadas respectivamente ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C=O de aminoácidos. Dois ombros a 3000cm^{-1} e 2800cm^{-1} podem ser associados aos estiramentos assimétrico e simétrico de grupos metila de cadeias alifáticas respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). O espectro infravermelho indicou a presença tanto de aminoácidos como de cadeias alifáticas em ambos BS brutos, sugerindo a natureza lipopeptídica do BS.

Figura 18 - Espectro infravermelho do BSb3 (preto) e do BSp (vermelho) do BS produzido por *B. luteolum*.

5.5.3.2 Análise de metil ésteres de ácidos graxos (FAME)

Tanto, para o BSb3, como para o BSp foram detectados os mesmos 5 tipos de FAME por CG-EM (Figura 19), correspondentes aos ácidos graxos $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ e $C_{18:0}$ (Tabela 10), com porcentagens de intensidade relativa de 7,53%, 21,79%, 17,17%, 38,75%, e 14,76% para BSb3 e 3,61%, 4,84%, 7,25%, 52,41%, 31,89% para o BSp. Este resultado sugere que o BS produzido pode ser uma mistura de lipopeptídeos com cadeias de ácidos graxos simples (não ramificadas e hidroxiladas) cujo comprimento pode variar entre 10 -18 carbonos. A presença de 5 tipos de ácidos graxos não indica necessariamente a existência de 5 tipos de lipopeptídeos, uma vez que os ácidos graxos podem estar livres (como impurezas).

Kiran et al. (2010) relataram a presença dos ácidos graxos $C_{10:0}$, $C_{16:0}$ e $C_{18:0}$ além de três ácidos graxos ramificados no BS produzido por *B. aureum*. A proporção relativa do pico correspondente ao $C_{18:0}$ foi superior aos outros ácidos graxos, levando aos autores a propor que a porção lipídica da estrutura do BS era formada por cadeia C_{18} . Qiao e Shao (2010) também detectaram a presença dos ácidos graxos $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ e o $C_{18:0}$ no biossurfatante produzido pela bactéria marinha *Alcanivorax dieselolei* B-5. Assim como observado em nosso estudo os autores

identificaram somente ácidos graxos de cadeia simples no BS produzido por *A. dieselolei* B-5.

A presença dos mesmos tipos de FAME nos dois cromatogramas e a redução da intensidade relativa dos picos correspondentes aos ácidos graxos $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, e $C_{14:0}$ do BSp com respeito ao BSb3, confirmam que o BSp contém os mesmos componentes presentes no BSb3, mas, em uma menor proporção.

Figura 19 - Cromatogramas do a) BSb3 e b) do BSp após metanólise. Os picos numerados correspondem a 5 tipos de FAME diferentes.

Tabela 10 - Compostos preditos por CG-EM no BSb3 e no BSp.

Pico	Composto	Formula	Peso molecular
1	Decanoato de metila	$C_{11}H_{22}O_2$	186
2	Dodecanoato de metila	$C_{13}H_{26}O_2$	214
3	Tetradecanoato de metila	$C_{15}H_{30}O_2$	242
4	Hexadecanoato de metila	$C_{17}H_{34}O_2$	270
5	Metil octadecanoato	$C_{19}H_{38}O_2$	298

5.5.3.3 Analise do BS por espectrometria de massa

No espectro de massa do BSb3 foram identificados de três íons moleculares [M+H] com massas moleculares de m/z 353, 381 e 979 (Figura 20). Os dois primeiros picos apresentam uma diferença de 28 em suas massas moleculares que coincide exatamente com a massa de dois agrupamentos CH_2 , sendo provável que esses picos correspondam aos íons moleculares de dois lipopeptídeos homólogos com uma diferencia entre si de 2 carbonos no ácido graxo associado. Com base nos resultados obtidos na análise de aminoácidos por cromatografia de papel e análises de FAME por CG-EM a massa molecular desses íons pode ser calculada como $C_{16:0}$ + prolina - H_2O + H = 354,56 e $C_{18:0}$ + prolina - H_2O + H = 382,56. As estruturas propostas para os “amino-lipídeos” Pro- $C_{16:0}$ e Pro- $C_{18:0}$ é apresentada nas Figuras 21 e 22 juntamente com as fragmentações dos picos correspondentes.

Figura 20 - Espectro de massa do BSb3 produzido por *B. luteolum* na faixa de 105-1300 m/z .

Figura 21 - a) Fragmentação por CID (30,00eV) do íon molecular $[M+H]^+$ de $m/z = 381$. b) Estrutura molecular sugerida para o composto associado a esse íon molecular.

Figura 22 - a) Fragmentação por CID (30,00eV) do íon molecular $[M+H]^+$ de m/z 353.
b) Estrutura molecular sugerida para o composto associado a esse íon molecular.

Biossurfatantes do tipo amino-lipídeos já foram relatados na literatura. Qiao e Shao (2010) caracterizaram um prolina-lipídeo Pro-C_{16:0} produzido por *Alcanivorax dieselolei* B-5 similar ao encontrado neste trabalho utilizando a bactéria *B. luteolum*. Maneerat et al. (2006) descreveram a produção de ornitina-lipídeos por *Myroides* sp. Diferente dos prolina-lipídeos que apresentam ácidos graxos de cadeia simples, os ornitina-lipídeos contêm ácidos graxos ramificados e hidroxilados. Tal como a *B. luteolum*, as bactérias usadas nestes dois estudos também foram isoladas de ambiente marinho e apresentaram capacidade de degradar hidrocarbonetos, o que sugere que a biossíntese destes BS esteja relacionada à captação/utilização de substratos hidrofóbicos em meio aquoso.

Os biossurfatantes produzidos por bactérias marinhas tem sido explorados na biorremediação de poluentes hidrofóbicos (MARTINS; KALIL; COSTA, 2009). Segundo Cameotra e Bollag (2003) estes compostos aumentam a solubilidade desses poluentes em meio aquoso facilitando sua captação e degradação por microrganismos presentes na área contaminada. A capacidade de *B. luteolum* de crescer na presença de vaselina como sua única fonte de carbono e produzir amino-

lipídeos associados com o processo de captação deste substrato, sugere que esta bactéria e este tipo de BS podem ser explorados na bioremediação/biodegradação de poluentes hidrofóbicos de composição análoga a da vaselina em solos e em ambientes marinhos.

A vaselina utilizada neste trabalho apresentava alto grau de refinamento (grau U.S.P) ou seja, quase todos seus hidrocarbonetos são saturados (n-alcenos, isoalcenos e cicloalcenos entre 15 e 50 carbonos) contendo baixos teores de hidrocarbonetos aromáticos (CONCIN et al., 2011). Os hidrocarbonetos aromáticos, especialmente os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) estão presentes naturalmente no petróleo e em vários dos seus derivados e, muitos deles têm sido identificados como compostos carcinogénicos (ATSDR, 2009). Os PAH são compostos de baixa solubilidade em meio aquoso o que faz deles poluentes persistentes, difíceis de remover ou biodegradar. Os BS podem aumentar a taxa de biodegradação de PAH através de mecanismos como a solubilização, mobilização e emulsificação que incrementam a biodisponibilidade destes substratos insolúveis (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). Nesse sentido seria importante também estudar o potencial de biodegradação de PAH por parte de *B. luteolum*.

O íon molecular de massa 979 foi fragmentado e as massas dos fragmentos resultantes analisadas (Figura 23a). A massa do íon molecular do lipopeptídeo pode ser calculada como: $C_{16:0} + \text{fenilalanina} + \text{alanina} + 2*(\text{leucina}) + 2*(\text{prolina}) + \text{treonina} - 8*(H_2O) + H = 979$. A estrutura proposta para o lipopeptídeo é mostrada na Figura 23b.

Figura 23 - a) Fragmentação por CID (28,00eV) do íon molecular $[M+H]^+$ de m/z 979.
b) Estrutura molecular sugerida para o composto associado a esse íon molecular.

A estrutura sugerida para o lipopeptídeo produzido por *B. luteolum* assim como a estrutura proposta por Kiran et al. (2010) para o lipopeptídeo produzido por *B. aureum*, contém uma porção peptídica linear. Porém os lipopeptídeos mais estudados como a surfactina, a iturina e a fengicina produzidos por *B. subtilis*, as gramicidinas produzidas por *B. brevis* e as polimixinas produzidas por *B. polymyxa*, apresentam uma porção peptídica cíclica.

Evidentemente, a caracterização estrutural do biossurfatante não foi completa. As estruturas propostas até o momento precisam ser confirmadas por ressonância magnética nuclear. Para isso, o BSp deve ser obtido com maior grau de pureza para permitir a correta interpretação dos sinais no espectro de RMN.

5.6 Atividade antimicrobiana

Não encontrou-se atividade antimicrobiana contra as cepas bacterianas, na faixa de concentrações de BSb3 e BSp testadas.

A atividade antimicrobiana dos amino-lipídeos ainda não foi reportada. De acordo com Qiao e Shao (2010) os prolina-lipídeos produzidos por *Alcanivorax dieselolei* B-5 também não mostraram atividade antimicrobiana contra as cepas de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *R. solani*.

A partir das análises de espectrometria de massas concluiu-se que *B. luteolum* pode produzir dos tipos de BS, amino-lipídeos e lipopeptídeos, sendo que estes podem apresentar atividades antimicrobianas diferenciadas entre si. Por exemplo, as iturinas produzidas por *B. subtilis* apresentam uma capacidade antimicrobiana diferente das surfactinas produzidas pela mesma bactéria. Enquanto as surfactinas apresentam alta atividade antimicrobiana, antiviral e pouca atividade antifúngica, as iturinas apresentam uma alta atividade antifúngica, uma limitada atividade antibacteriana e nenhuma atividade antiviral (ONGENA; JACQUES, 2008). Assim é importante avaliar a ação antifúngica e antiviral dos BS produzidos por *B. luteolum*.

6 PRINCIPAIS RESULTADOS

- i. A extração com resina de adsorção foi mais efetiva na recuperação do BS produzido por *B. luteolum* do que a extração por precipitação ácida.
- ii. Os fatores que afetam significativamente a produção de BS foram a concentração da fonte de carbono e a concentração de água do mar artificial no meio de produção.
- iii. Os valores dos fatores, com os quais, obteve-se o maior acúmulo de BS dentro das faixas testadas foram: 2% de fonte de nitrogênio, 4% de fonte de carbono e 20% de ASW obtendo-se uma tensão superficial de $27,7\text{mNm}^{-1}$.
- iv. O maior acúmulo de BS foi obtido com uma relação C/N de 2, indicando que a produção de BS pode ser maximizada sem uma limitação da fonte de nitrogênio.
- v. A partir da análise estrutural estabeleceu-se que o BS produzido por *B. luteolum* corresponde provavelmente a uma mistura de lipopeptídeos com cadeias de ácidos graxos que podem variar entre 10-18 carbonos e com um conteúdo de proteína total do 5%. Três estruturas químicas foram sugeridas: duas correspondentes a prolina-lipídeos com ácidos graxos $\text{C}_{16:0}$ e $\text{C}_{18:0}$ e uma correspondente a um lipopeptídeo de sequência peptídica Phe-Al-X-X-Pro-Pro-Thr ($\text{X}=\text{Leu/Ile}$) e com um ácido graxo $\text{C}_{16:0}$.
- vi. Não encontrou-se atividade antimicrobiana frente as cepas bacterianas patógenas na faixa de concentrações de BS testadas.

7 CONCLUSÃO

O processo de produção e extração do biossurfatante produzido pela bactéria *Brevibacterium luteolum* foi estudado e o BS foi descrito como uma mistura de lipopeptídeos cujas estruturas químicas foram propostas. A produção de BS foi melhorada com base ao planejamento fatorial, determinando-se, com ajuda desta ferramenta, que os fatores que afetam significativamente a produção de BS são a fonte de carbono e a concentração de água do mar artificial, e que sua produção pode ser melhorada sem uma limitação da fonte nitrogênio.

8 PERSPECTIVAS

- vii. Continuar o planejamento fatorial visando obter um mínimo local na superfície de resposta, com o qual se otimizaria a produção do BS.
- viii. Melhorar a metodologia de purificação do BS com o objetivo de completar sua caracterização estrutural.
- ix. Separar cada um dos lipopeptídeos presentes no BS para sua caracterização físico-química.
- x. Explorar o uso de *B. luteolum* e o BS para a biorremediação/biodegradação de poluentes orgânicos e na recuperação melhorada de petróleo.
- xi. Testar a atividade antifúngica e antiviral dos BS.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A.-H. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 329–345, 2009.
- AL-ARAJI, L.; NOOR, R.; RAJA, Z.; RAHMAN, A. MINIREVIEW Microbial Surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 99–105, 2007.
- ARUTCHELVI, J. I.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Mannosylerythritol lipids: a review. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1559–1570, 2008.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000.
- BEDNARSKI, W.; NARWOJSZ, M.; ADAMCZAK, M.; NAWOTKA, R. Carbon-source-dependent synthesis and composition of biosurfactant synthesized by *Pseudozyma antarctica*. **Environmental Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 31–36, 2006.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 1–8, 2004.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1, p. 41–52, 1999.
- CAMEOTRA, S. S.; BOLLAG, J.-M. Biosurfactant-Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 111–126, 2003.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520–529, 1998.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262–6, 2004.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 97–116, 2010.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A.; DE LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology progress**, v. 29, n. 5, p. 1097–1108, 2013.

CONCIN, N.; HOFSTETTER, G.; PLATTNER, B.; TOMOVSKI, C.; FISELIER, K.; GERRITZEN, K.; SEMSROTH, S.; ZEIMET, A. G.; MARTH, C.; SIEGL, H.; RIEGER, K.; ULMER, H.; CONCIN, H.; GROB, K. Evidence for Cosmetics as a Source of Mineral Oil Contamination in Women. **Journal of Women's Health**, v. 20, n. 11, p. 1713–1719, 2011.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173–176, 1984.

DALTIN, D. **Tensoativos: Química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2011.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1675–1684, 2008.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Microbial surfactants of marine origin: potentials and prospects. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 672, p. 88–101, 2010.

DE ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848–858, 2013.

DE CARVALHO, C. C. C. R.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 705–727, 2010.

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

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

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DEVELTER, D. W. G.; LAURYSEN, L. M. L. Properties and industrial applications of sophorolipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 628–638, 2010.

DHASAYAN, A.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Production and characterisation of glycolipid biosurfactant by *Halomonas* sp. MB-30 for potential application in enhanced oil recovery. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2571–2584, 2014.

FERHAT, S.; MNIF, S.; BADIS, A.; EDDOUAOUA, K.; ALOUAOUI, R.; BOUCHERIT, A.; MHIRI, N.; MOULAI-MOSTEFA, N.; SAYADI, S. Screening and preliminary characterization

of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 8, p. 1182–1188, 2011.

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

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; RAIMONDI, C.; BESTETTI, G.; BANAT, I. M.; SMYTH, T. J.; PAPACCHINI, M.; CAVALLO, M.; FRACCHIA, L. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5. **Bioresource technology**, v. 108, p. 245–251, 2012.

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

GHRIBI, D.; MNIF, I.; BOUKEDI, H.; KAMMOUN, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Statistical optimization of low-cost medium for economical production of *Bacillus subtilis* biosurfactant, a biocontrol agent for the olive moth *Prays oleae*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 27, p. 4927–4936, 2011.

GOMAA, E. Z. Antimicrobial Activity of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* Strain M104 Grown on Whey. **BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY**, v. 56, n. 2, p. 259–268, 2013.

GU, X.-B.; ZHENG, Z.-M.; YU, H.-Q.; WANG, J.; LIANG, F.-L.; LIU, R.-L. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3196–3201, 2005.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1–6, 1986.

HAALAND, P. D. **Experimental Design in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989.

HALTRICH, D.; LAUSSAMAYER, B.; STEINER, W. Xylanase formation by *Sclerotium rolfsii* : effect of growth substrates and development of a culture medium using statistically designed experiments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 522–530, 1994.

HE, G.; CHEN, Q.; JU, X.; SHI, N. Improved elastase production by *Bacillus* sp. EL31410-- further optimization and kinetics studies of culture medium for batch fermentation. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 5, n. 2, p. 149–156, 2004.

HELMY, Q.; KARDENA, E.; FUNAMIZU, N.; WISJNUPRAPTO, N. A. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. **International Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 1/2, p. 66–86, 2011.

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

HILDEBRAND, P. D.; BRAUN, P. G.; MCRAE, K. B.; LU, X. Role of the biosurfactant viscosin in broccoli head rot caused by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 20, n. 3, p. 296–303, 1998.

HOMMEL, R.; STIIWER, O.; STUBER, W.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H.-P. Applied Microbiology Biotechnology by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 199–205, 1987a.

HOMMEL, R.; STIIWER, O.; STUBER, W.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H.-P. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 3, p. 199–205, 1987b.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W. M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 243–248, 1990.

HUSAIN, D. R.; GOUTX, M.; ACQUAVIVA, M.; GILEWICZ, M.; BERTRAND, J.-C. Short Communication : The effect of temperature on eicosane substrate uptake modes by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617 : relationship with the biochemical content of cells and supernatants. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 13, p. 587–590, 1997.

IRFAN-MAQSOOD, M.; SEDDIQ-SHAMS, M. Rhamnolipids: Well-Characterized Glycolipids with Potential Broad Applicability as Biosurfactants. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 285–291, 2014.

ISLAS, D. J.; MORENO, S. A. M.; RODRÍGUEZ, J. N. G. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensioactivos: una revisión. **Revista Internacional de contaminación Ambiental**, v. 26, n. 1, p. 65–84, 2010.

IVANKOVIĆ, T.; HRENOVIĆ, J. Surfactants in the environment. **Arhiv za higijenu rada i toksikologiju**, v. 61, n. 1, p. 95–110, 2010.

JOSHI, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 313–319, 2007.

KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 581–590, 2003.

KENNEDY, J.; MARCHESI, J. R.; DOBSON, A. D. Marine metagenomics: strategies for the discovery of novel enzymes with biotechnological applications from marine environments. **Microbial cell factories**, v. 27, n. 7, p. 1–5, 2008.

KIM, H.-S.; YOON, B.-D.; LEE, C.; SUH, H.-H.; OH, H.-M.; KATSURAGI, T.; YOSHIKI, T. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41–46, 1997.

KIRAN, G. S.; HEMA, T. A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T. A.; RAVJI, R. T.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from the

sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250–256, 2009.

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

KIRAN, G. S.; SABU, A.; SELVIN, J. Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. **Journal of biotechnology**, v. 148, n. 4, p. 221–225, 2010.

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

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

KOGLIN, A.; DOETSCH, V.; BERNHARD, F. Molecular engineering aspects for the production of new and modified biosurfactants. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 672, p. 158–169, 2010.

LANDMAN, D.; GEORGESCU, C.; MARTIN, D. A.; QUALE, J. Polymyxins revisited. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 449–465, 2008.

LIMA, T. M. S.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDÃO, F. D.; CARVALHO, A. M. X.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v. 22, n. 3, p. 585–592, 2011.

LIN, S.; JIANG, H. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. **Biotechnology Techniques**, v. 11, n. 6, p. 413–416, 1997.

LIN, S.-C. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 109–120, 1996.

LIU, X.; REN, B.; GAO, H.; LIU, M.; DAI, H.; SONG, F.; YU, Z.; WANG, S.; HU, J.; KOKARE, C. R.; ZHANG, L. Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2012.

LOTIFY, W. A.; GHANEM, K. M.; EL-HELOW, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Bioresource technology**, v. 98, n. 18, p. 3470–3477, 2007.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International journal of cosmetic science**, v. 31, n. 4, p. 255–261, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p. 202–209, 2013.

MA, Z.; WANG, N.; HU, J.; WANG, S. Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. **The Journal of antibiotics**, v. 65, n. 6, p. 317–322, 2012.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant Production by Microorganisms on Unconventional Carbon Sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, n. 2, p. 237–241, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428–434, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2011.

MANEERAT, S.; BAMBA, T.; HARADA, K.; KOBAYASHI, A.; YAMADA, H.; KAWAI, F. A novel crude oil emulsifier excreted in the culture supernatant of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 2, p. 254–259, 2006.

MANEERAT, S.; NITODA, T.; KANZAKI, H.; KAWAI, F. Bile acids are new products of a marine bacterium, *Myroides* sp. strain SM1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 679–683, 2005.

MANIVASAGAN, P.; SIVASANKAR, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S.-K. Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 5, p. 783–797, 2014.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. In situ bioremediation using biosurfactant produced by solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 843–851, 2009.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents : Applications in Food Safety and Therapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

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

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The Use of Agroindustrial By-Products for Biosurfactant Production. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 1, p. 61–64, 1994.

MNIF, I.; CHAABOUNI-ELLOUZE, S.; GHRIBI, D. Optimization of the Nutritional Parameters for Enhanced Production of *B. subtilis* SPB1 Biosurfactant in Submerged Culture Using Response Surface Methodology. **Biotechnology research international**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

MORITA, T.; ISHIBASHI, Y.; HIROSE, N.; WADA, K.; TAKAHASHI, M.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid B, from sugarcane juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 7, p. 1371–1376, 2011.

MOUSSA, T. A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 867–880, 2014.

MUKHERJEE, A.; DAS, K. Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 54–64, 2010.

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

MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; GERLITZKI, M.; HÖRMANN, B.; PÖHNLEIN, M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids-next generation surfactants? **Journal of biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 366–380, 2012.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 372–378, 2009.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 23–29, 1990.

NEU, T. R.; HÄRTNER, T.; PORALLA, K. Surface active properties of viscosin : a peptidolipid antibiotic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 518–520, 1990.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 252–259, 2007.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADDAD, R.; GONC, L. A. G.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology progress**, v. 21, n. 5, p. 1562–1566, 2005.

- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p. 81–85, 2004.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- 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. 121-124, p. 465–473, 2005.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.
- PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–654, 2011.
- PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F.; KOSARIC, N. Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 4, p. 357–362, 2005.
- PENG, F.; WANG, Y.; SUN, F.; LIU, Z.; LAI, Q.; SHAO, Z. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 3, p. 698–705, 2008.
- QAZI, M. A.; KANWAL, T.; JADOON, M.; AHMED, S.; FATIMA, N. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 5, p. 1065–1075, 2014.
- QIAO, N.; SHAO, Z. Isolation and characterization of a novel biosurfactant produced by hydrocarbon-degrading bacterium *Alcanivorax dieselolei* B-5. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 1207–1216, 2010.
- RANGARAJAN, V.; DHANARAJAN, G.; KUMAR, R.; SEN, R.; MANDAL, M. Time-dependent dosing of Fe²⁺ for improved lipopeptide production by marine *Bacillus megaterium*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 12, p. 1661–1669, 2012.
- RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M.; REHMAN, A. Production kinetics and tensioactive characteristics of biosurfactant from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant grown on waste frying oils. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 20, p. 1623–1631, 2006.
- REILING, H. E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L. H.; HIRT, R.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and environmental microbiology**, v. 51, n. 5, p. 985–989, 1986.
- RIKALOVIC, M.; GOJGIC-CVIJOVIC, G.; VRVIC, M.; KARADZIC, I. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain ai. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 1, p. 27–42, 2012.

- RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609–618, 2006a.
- RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; VAN DER MEI, H. C. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 1–10, 2006b.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2001.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154–162, 1999.
- ROSLER, K.-H.; GOODWIN, R. S. A General Use of Amberlite XAD-2 Resin for the Purification of Flavonoids from Aqueous Fractions. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 1, p. 188–188, 1984.
- SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005–1016, 2013.
- SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants : Fermentation , Current Developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, p. 1–39, 2011.
- SARAFIN, Y.; DONIO, M. B. S.; VELMURUGAN, S.; MICHAELBABU, M.; CITARASU, T. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 511–519, 2014.
- SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 436–450, 2010a.
- SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010b.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. F.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 4. ed. New York: Wiley, 2005.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142–6, 2004.
- SLEIMAN, J. N.; KOHLHOFF, S. A.; ROBLIN, P. M.; WALLNER, S.; GROSS, R.; HAMMERSCHLAG, M. R.; ZENILMAN, M. E.; BLUTH, M. H. Sophorolipids as Antibacterial Agents. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 39, n. 1, p. 60–63, 2009.

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

SPELLBERG, B.; BLASER, M.; GUIDOS, R. J.; BOUCHER, H. W.; BRADLEY, J. S.; EISENSTEIN, B. I.; GERDING, D.; LYNFIELD, R.; RELLER, L. B.; REX, J.; SCHWARTZ, D.; SEPTIMUS, E.; TENOVER, F. C.; GILBERT, D. N. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 52, n. Suppl 5, p. S397–S428, 2011.

STROBEL, R. J.; NAKATSUKASA, W. M. Response surface methods for optimizing *Saccharopolyspora spinosa*, a novel macrolide producer. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 11, p. 121–127, 1993.

SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Microbial biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 615–616, 2010.

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

VAN BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, 2011.

VAN DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology advances**, v. 9, n. 2, p. 241–252, 1991.

VILELA, W. F. D. **Seleção, caracterização e aplicação de novos biossurfatantes produzidos por bactérias marinhas a partir de substratos de baixo custo**. [s.l.] Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

VILELA, W. F. D.; FONSECA, S. G.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; NITSCHKE, M. Production and Properties of a Surface-Active Lipopeptide Produced by a New Marine *Brevibacterium luteolum* Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2245–2256, 2014.

WAUTERS, G.; AVESANI, V.; LAFFINEUR, K.; CHARLIER, J.; JANSSENS, M.; VAN BOSTERHAUT, B.; DELMÉE, M. *Brevibacterium lutescens* sp. nov., from human and environmental samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1321–1325, 2003.

WHITE, D. A.; HIRD, L. C.; ALI, S. T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 744–755, 2013.

XU, Q.; NAKAJIMA, M.; LIU, Z.; SHIINA, T. Biosurfactants for microbubble preparation and application. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 462–475, 2011.

ZAIA, D. A M.; THAÏS, C.; ZAIA, B. V. Determinação De Proteínas Totais Via Espectrofometria: Vantagens E Desvantagens Dos Métodos Existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of basic microbiology**, v. 42, n. 1, p. 67–73, 2002.