

SILVIA MESSIAS BUENO

BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES:
ISOLAMENTO, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
COMPORTAMENTO NUM SISTEMA MODELO

Tese apresentada para a obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao programa de pós-graduação Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, SP.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2008

SILVIA MESSIAS BUENO

BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES:
ISOLAMENTO, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
COMPORTAMENTO NUM SISTEMA MODELO

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

1º. Examinador: Prof^a. Dr^a. Iracema de Oliveira Moraes

2º. Examinador: Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho.....

3º. Examinador: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

4º. Examinador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

5º. Examinador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

6º. Examinador: Prof. Dr. Maurício Boscolo.....

7º. Examinador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto, 02 de junho de 2008.

DADOS CURRICULARES

SILVIA MESSIAS BUENO

NASCIMENTO	08.12.1974 - GUARULHOS/SP
FILIAÇÃO	Lourival Messias Bueno Alice Coelho Bueno
1993/1996	Curso de Graduação Química (Bacharelado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP
1997/1998	Bolsista de aperfeiçoamento do CNPq no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos no Instituto de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas - UNESP
1998/2000	Curso de Pós-graduação – Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos no Instituto de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas - UNESP
2005/2008	Curso de Pós-graduação – Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos no Instituto de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas - UNESP

Aos meus pais por estarem sempre presentes.

Ao Tony por sempre me apoiar.

A minha filha Eloá.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz por ajudar na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pelo apoio e paciência durante a execução desta pesquisa, especialmente as amigas Adriana Navarro da Silva, Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes e Paloma Regina Micheleto Nogueira.

Ao Departamento de Química do IBILCE-UNESP por ter permitido a utilização de alguns equipamentos para esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva - USP- Ribeirão Preto-SP, pela determinação da análise de RMN.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral - USP- Ribeirão Preto-SP, pelas valiosas sugestões na discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos de Araújo pela revisão ortográfica.

A Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio para a manutenção dos equipamentos do laboratório.

Se conheces o inimigo e te conheces a ti mesmo, não precisas temer o resultado de cem batalhas. Se te conheces a ti mesmo, mas não conheces o inimigo, por cada vitória sofrerás também uma derrota. Se não te conheces a ti mesmo nem conheces o inimigo, perderás todas as batalhas.

Sun Tzu

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FOTOGRAFIAS	x
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1. BIOTECNOLOGIA	7
3.2. SURFACTANTES	8
3.3. BLOSSURFACTANTES	17
3.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES	25
3.5. APLICAÇÕES DOS BLOSSURFACTANTES	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Isolamento e caracterização das bactérias produtoras	35
4.2. Manutenção das bactérias produtoras	35
4.3. Identificação das bactérias	35
4.4. Produção dos biossurfactantes	36
4.4.1. Microrganismos	36
4.4.2. Meio base	36
4.4.3. Meio de produção	36
4.4.4. Produção do biossurfactante	37
4.5. Determinação da presença de biossurfactantes	37
4.5.1. Determinação da tensão superficial	37
4.5.2. Índice de emulsificação (E_{24})	37
4.5.3. Determinação da atividade emulsificante	38
4.5.4. Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	38
4.5.5. Separação dos biossurfactantes	38
4.5.6. Determinação do crescimento celular	38
4.5.7. Purificação do biossurfactante	38
4.5.8. Atividade antimicrobiana	39
4.5.9. Fluidez do petróleo	39
4.6. Determinação da composição do biossurfactante	40
4.7. Determinação do efeito do biossurfactante num sistema modelo sal-vinagre-azeite	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Isolamento das bactérias produtoras de biossurfactantes	41
5.2. Identificação das bactérias	45
5.3. Determinação dos parâmetros de produção	50
5.4. Estudo da fluidez do petróleo	64
5.5. Determinação da atividade antimicrobiana	67
5.6. Determinação do efeito do biossurfactante num sistema modelo sal-vinagre-azeite	67
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Molécula de tensoativo (surfactante).	10
Figura 2 -	Organização das moléculas de tensoativos.	10
Figura 3 -	Diagrama da variação de tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com relação a concentração de tensoativo.	13
Figura 4 -	Comportamento de composto orgânico antes (a) e após (b) adição de tensoativo.	14
Figura 5 -	Estruturas químicas de alguns biossurfactantes produzidos por: (a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (b) <i>Rhodococcus erythropolis</i> (c) <i>Candida bombicola</i> (d) <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> e (e) <i>Bacillus subtilis</i> .	27
Figura 6 -	Representação das principais etapas utilizadas durante a identificação do gênero das bactérias selecionadas.	48
Figura 7 -	Determinação da tensão superficial no sobrenadante livre de células em diferentes fontes de carbono e concentrações a 30 ⁰ C e 72 horas de incubação dos <i>Bacillus</i> sp selecionados.	56
Figura 8 -	Porcentagem do índice de emulsificação dos <i>Bacillus</i> sp selecionados em relação às diferentes fontes de carbono e concentrações a 30 ⁰ C e 72 horas de incubação.	57
Figura 9 -	Determinação da concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células do <i>Bacillus</i> sp (2C) em sacarose e caldo de cana.	61
Figura 10 -	Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) do biossurfactante.	63
Figura 11 -	Dados estatísticos do delineamento experimental num sistema modelo sal-vinagre-azeite.	69
Figura 12 -	Superfície de resposta para a região ao redor dos valores ótimos de azeite e vinagre para o índice de emulsificação (índice de emulsificação (%) = $36,7436 + 2,6596*x - 7,6484*y - 0,2531*x*x - 0,1417*x*y + 0,5819*y*y$).	70
Figura 13 -	Superfície de resposta para a região ao redor dos valores ótimos de vinagre e sal para o índice de emulsificação (índice de emulsificação (%) = $34,8059 + 273,5274*x - 7,6733*y - 1749,5199*x*x - 12,4259*x*y + 0,5819*y*y$).	71
Figura 14 -	Superfície de resposta para a região ao redor dos valores ótimos de azeite e sal para o índice de emulsificação (índice de emulsificação (%) = $4,3607 + 360,6262*x - 3,5927*y - 1749,5199*x*x - 29,8457*x*y + 0,2531*y*y$).	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tensão superficial e concentração micelar crítica dos biossurfactantes e surfactantes sintéticos.	12
Tabela 2 -	Diferentes valores de balanço hidrofílico-lipofílico para surfactantes não-iônicos.	14
Tabela 3 -	Toxicidade dos biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos.	20
Tabela 4 -	Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.	26
Tabela 5 -	Coloração de Gram das bactérias isoladas das cinco amostras de solo e areia de praia.	42
Tabela 6 -	Teste de hemólise em placas de Petri contendo ágar-sangue para as colônias isoladas de solo e areia de praia.	44
Tabela 7 -	Características bioquímicas das bactérias selecionadas.	46
Tabela 8 -	Fontes de coleta das quatro bactérias selecionadas relacionadas aos respectivos gêneros.	50
Tabela 9 -	Leituras de tensão superficial (Din/cm), índice de emulsificação (%) e peso celular seco (g) dos <i>Bacillus</i> sp em diferentes pH e tempo de fermentação.	53
Tabela 10 -	Determinação do peso celular seco (g) dos <i>Bacillus</i> sp em 50 mL do caldo de fermentação selecionadas em diferentes fontes de carbono e concentrações.	58
Tabela 11 -	Determinação da atividade emulsificante no sobrenadante livre de células a 610 nm dos <i>Bacillus</i> sp selecionados.	59
Tabela 12 -	Delineamento experimental dos ensaios para um sistema modelo sal-vinagre-azeite.	68

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 -	Placas de ágar-sangue com halo de β -hemólise positiva.	43
Fotografia 2 -	Testes bioquímicos: a) nitrato, b) motilidade, c) fermentação de açúcares, d) amilase, e) urease e f) citrato.	47
Fotografia 3 -	Representação microscópica das bactérias Gram +: a) 4D; b) 1G; c) 2C e d) 5A.	49
Fotografia 4 -	Caldo de fermentação durante incubação a 30°C e 200 rpm em “shaker” rotativo.	51
Fotografia 5 -	Tensiômetro de Leconde Du Nouy.	52
Fotografia 6 -	Determinação do índice de emulsificação por meio da formação de uma coluna de tolueno.	52
Fotografia 7 -	Biossurfactante obtido por precipitação com etanol a 4°C.	62
Fotografia 8 -	Diálise para a purificação do biossurfactante.	62
Fotografia 9 -	Análise macroscópica da fluidez do petróleo.	65
Fotografia 10 -	Análise macroscópica da fluidez do petróleo na presença dos inóculos bacterianos.	66

BUENO, S. M. *Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo*. São José do Rio Preto.

RESUMO

Surfactantes são agentes ativos de superfície amplamente utilizados em vários setores industriais. Estas moléculas, com propriedades anfífilas, são produzidas química ou biologicamente. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo. Em vista de suas vantagens ecológicas, há um grande interesse comercial na substituição de surfactantes sintéticos por naturais. Nesta pesquisa, foram coletadas cinco amostras de solos contaminados e não contaminados por hidrocarbonetos designadas 1, 2, 3, 4 e 5 das quais foram isoladas vinte e oito colônias bacterianas pela técnica de diluição decimal em tubos de ensaio e plaqueamento em placas de Petri contendo meio PCA (Ágar Padrão para Contagem). As bactérias isoladas foram coradas pelo método de Gram para observação das características morfológicas. Destas, apenas treze apresentaram hemólise em placas de Ágar Sangue, o que indicou a presença de biossurfactante. Posteriormente, estas foram cultivadas em meio de produção contendo sais minerais e o caldo de cultura, sem a presença de células, foi utilizado para a determinação da tensão superficial e do índice de emulsificação. As oito bactérias cujos caldos (sem a presença de células) apresentaram diminuição de tensão superficial de no mínimo 20% e índice de emulsificação estável após 24 horas foram selecionadas para realização de testes bioquímicos para identificação. A análise dos resultados destes testes mostrou que as bactérias pertencem ao gênero *Bacillus*. Foi determinada a otimização da produção de biossurfactantes em caldo de fermentação utilizando diferentes pH (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), tempo de fermentação (48, 72 e 96 horas) e diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, manitol, frutose, glicose + frutose e caldo de cana) nas concentrações 1, 2, 3, 4 e 5%. Os resultados obtidos mostraram que pH 5,0 e 7,0; tempo de fermentação de 72 horas e sacarose em baixas concentrações tiveram a maior produção de biossurfactante. A bactéria 2C (*Bacillus* sp) isolada de solo contaminado de posto de gasolina apresentou-se como a melhor produtora de biossurfactante. Esta foi então selecionada para produção de biossurfactante e para a determinação da concentração micelar crítica (CMC) e foi observada uma baixa CMC, indicando ser um ótimo surfactante. Posteriormente, o

biossurfactante foi precipitado com 2 volumes de etanol e seco até peso constante, obtendo-se o rendimento de 30,25% em relação à concentração da fonte de carbono. O biossurfactante obtido foi dialisado durante 72 horas para purificação e submetido à análise de ressonância magnética nuclear (RMN), além da determinação da composição centesimal da molécula do biossurfactante (proteínas, carboidratos e lipídeos). Constatou-se a presença de um biossurfactante tipo carboidrato-proteína-lipídeo. A bactéria 2C foi identificada como *Bacillus pumilus*. Foi realizado também o teste da degradação de petróleo utilizando as bactérias 1G, 2C, 4D e 5A cultivadas em caldo nutriente e por análise macroscópica observou-se que todas degradam o petróleo bruto deixando-o mais fluido. Não foi constatada atividade bactericida nem fungicida e sim bacteriostática e fungistática nos sobrenadantes das bactérias produtoras de biossurfactantes. Foi também estudado o comportamento do biossurfactante obtido com a bactéria 2C (*Bacillus pumilus*) num sistema modelo sal-vinagre-azeite e mostrou ser um ótimo emulsificante em molhos para salada.

Palavras chave: biossurfactantes, solo, bactérias produtoras e isolamento.

BUENO, S. M. *Bacteria Producers of Biosurfactants: Isolation, Production, Characterization and Behavior in a Model System*. São José do Rio Preto.

ABSTRACT

Surfactants are surface-active agents widely used in various industries. These molecules, with amphiphilic properties, are produced chemical or biologically. The vast majority of commercially available surfactants is synthesized from oil derivatives. In view of its environmental benefits, there is a large commercial interest in the replacement of natural by synthetic surfactants. In this survey, were collected five samples of contaminated and not contaminated soil by hydrocarbons designated 1, 2, 3, 4 and 5 which were isolated twenty-eight bacterial colonies by the technique of decimal dilution in test tubes, and plating in Petri dishes containing PCA medium (Plate Count Agar) The bacteria isolated were stained by the method of Gram for observation of morphological characteristics. Of these, only thirteen had haemolysis in blood agar plates, which indicated the presence of biosurfactant. Later, they were grown in a production medium containing minerals and the culture broth, without the presence of cells was used to determine the surface tension and the emulsification index. The eight bacteria whose broths (without the presence of cells) had reduction of surface tension of at least 20% and emulsification index stable after 24 hours were selected to carrying out biochemical test for identification. The results of these tests showed the bacteria belong to the genus *Bacillus*. It was determined the optimization of production of biosurfactants in fermentation broth using different pH (5.0, 6.0, 7.0 and 8.0), fermentation time (48, 72 and 96 hours) and different carbon sources (glucose, sucrose, mannitol, fructose, glucose + fructose and cane juice) at concentrations 1, 2, 3, 4 and 5%. The results showed that pH 5.0 and 7.0; time of 72 hours and fermentation of sucrose at low concentrations had the best production of biosurfactant. The 2C bacteria (*Bacillus* sp) isolated from contaminated soil in place of petrol presented itself as the best producer of biosurfactant. This was then selected to the production of biosurfactant and for the determination the critical micellar concentration (CMC) and was observed that showed a low CMC, stating be a great surfactant. Subsequently, the biosurfactant was precipitated with 2 volumes of ethanol and dry up until constant weight, resulting in the yield of 30.25% compared to the concentration of carbon source. The biosurfactant obtained was dialysis for 72

hours to purification and submitted for analysis of nuclear magnetic resonance (NMR), and the proximate composition of the molecule biosurfactant (proteins, carbohydrates and lipids). We noticed the presence of a biosurfactant type carbohydrate-protein-lipid. The bacterium 2C was identified as *Bacillus pumilus*. It was also carried out the oil degradation test using the bacteria 1G, 2C, 4D and 5A grown in nutrient broth and by macroscopic analysis was observed that all of them degrade the crude oil leaving it more fluid. No activity fungicide or bactericide was detected and only bacteriostatic and fungistatic supernatant of bacteria in producing biosurfactants. It was also studied the behavior of biosurfactant obtained with the bacterium 2C (*Bacillus pumilus*) system model salt-vinegar-oil proved a great emulsifier in salad dressings.

Key word: biosurfactants, soil, producer bacteria and isolation.

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em vários setores de diferentes tipos de indústrias onde encontram aplicação em uma larga variedade de processos industriais. Estas moléculas possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas e são produzidas química ou biologicamente. Os surfactantes reduzem a tensão superficial, formando microemulsões, promovendo a dispersão de hidrocarbonetos nas soluções aquosas. Tal característica é comercialmente interessante para a produção de detergentes, emulsificantes e espumas para as indústrias de alimentos, cosmética, farmacêutica e química.

Os tensoativos ou surfactantes têm sido utilizados industrialmente como adesivos, floculantes, espumantes, desemulsificantes e penetrantes. Na indústria petroquímica eles são tradicionalmente usados na extração de óleo. Nesse caso, os tensoativos aumentam a solubilidade dos componentes do petróleo ou diminuem a tensão interfacial, promovendo a sua mobilização.

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo. Nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica.

O aumento da preocupação ambiental combinado com as novas legislações de controle do meio ambiente levou a procura por surfactantes naturais como alternativa aos sintéticos existentes. A tendência de substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais, é motivada pela necessidade da diminuição de produtos não biodegradáveis por substâncias mais específicas e menos agressivas ao ambiente.

Os microrganismos sintetizam compostos com propriedades surfactantes como subprodutos metabólicos, sendo neste caso denominados biosurfactantes. Estes são também moléculas anfifílicas que atuam na interface das emulsões e em termos de tensão superficial, estabilidade à temperatura e pH, são comparáveis aos surfactantes sintéticos.

2. OBJETIVOS

- Isolar, selecionar e caracterizar microrganismos produtores de biossurfactantes, a partir de amostras de solos não contaminados e contaminados por hidrocarbonetos.
- Determinar os parâmetros de produção dos biossurfactantes em caldo de fermentação.
- Realizar a caracterização físico-química dos biossurfactantes obtidos.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos microrganismos produtores e seus biossurfactantes.
- Determinar a capacidade emulsificante dos microrganismos produtores em petróleo bruto.
- Determinar o efeito da aplicação do biossurfactante obtido num sistema modelo sal-vinagre-azeite.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BIOTECNOLOGIA

Biotecnologia é definida como o conjunto de princípios científicos aplicados a procedimentos de produção material para obter bens e serviços mediante a utilização de agentes biológicos. Está integrada por um conjunto de técnicas que utilizam substâncias vivas (ou parte delas) para modificar ou fabricar um bem. As aplicações da biotecnologia são múltiplas: vão desde o aumento da produtividade da terra cultivável à produção de novos medicamentos, vacinas e materiais de diagnóstico, passando pela conservação da biodiversidade genética e a restauração de elementos como a água, o ar e o solo (OPAS, 1992).

De um modo geral, o conceito de biotecnologia pode incluir “qualquer técnica que utilize organismos vivos (ou partes de organismos), com o objetivo de produzir ou modificar produtos, aperfeiçoar plantas ou animais e descobrir microrganismos para usos específicos” (ALBAGLI, 1998).

Biotechnologia refere-se também a disposição que permite às tecnologias serem aplicadas em diversos setores industriais. Esta compreende três distintas atividades as quais recebem o nome de engenharia genética, engenharia de proteínas e engenharia de metabólitos (GAVRILESCU & CHISTI, 2005).

A exploração e a manipulação da natureza e de seus recursos, de início como simples matéria-prima, utilizados na construção de uma base material para as sociedades industrializadas, vem servindo como fonte para experimentação da ciência e da tecnologia avançada, dando origem à fabricação de produtos de alta sofisticação e de elevado valor agregado no mercado mundial (ALBAGLI, 1998).

Na nova era da industrialização global, muitas indústrias tradicionais estão enfatizando um redirecionamento para o surgimento de novas tecnologias. A biotecnologia tem uma missão desafiante que abre várias oportunidades de pesquisa. Uma vez que, faz uso de diversos compostos com propriedades tensoativas, seja na purificação de produtos biológicos ou em biocatálise e, esta também necessita dar resposta (preventiva e curativa) aos problemas que os tensoativos domésticos e industriais possam causar nas estações de tratamento de efluentes. Preocupações ambientais têm orientado a seleção de tensoativos em que, testes de biodegradabilidade e de toxicidade começaram a ter uma importância decisiva. Assim, existe a tendência de aproximar-se a produção do natural, atendendo o

princípio, segundo o qual a natureza, por si só, não tem capacidade de desfazer o que o homem faz (ROCHA, 1999, MULLER; RUSSEL; LUCASE, 1997).

A purificação do petróleo, água e solos contaminados, é um dos mais importantes problemas a ser resolvido. Um método científico útil na degradação de poluentes enfatiza o uso de microrganismos na indústria, mineração e recuperação do ecossistema. A emulsificação é também um método já empregado para a purificação de água contaminada com petróleo (CYBULSKY *et al.*, 2003).

Do ponto de vista dos microrganismos, o estudo da biodiversidade tem excepcional interesse científico. Só para se ter uma idéia, existe uma grande variedade de espécies de bactérias nas florestas úmidas. Estima-se que um grama de solo de uma floresta úmida possua inúmeras espécies de microrganismos e muitos destes produzem metabólitos secundários biologicamente ativos. Centenas de antibióticos descobertos nos últimos 50 anos são provenientes de bactérias. O potencial do uso de microrganismos para os processos biotecnológicos em saúde já é reconhecido. Os microrganismos contribuem para o equilíbrio de ecossistemas atuando intermediariamente entre a biogeosfera e os constituintes atmosféricos gasosos. Podem-se encontrar bactérias capazes de degradarem herbicidas, pesticidas, inseticidas, óleos e esgotos poluidores. As bactérias participam da reciclagem de compostos químicos na biosfera, incluindo a degradação de poluentes industriais. Desta forma, os microrganismos podem participar ativamente da construção de melhores condições de vida no planeta (GARCIA, 1995).

O uso de microrganismos em biotecnologia representa uma área em plena expansão. Entretanto, pouco se conhece sobre a diversidade dos microrganismos que constituem os ecossistemas naturais ou artificiais (ROSADO; DUARTE; MENDONÇA-HAGLER, 1999).

3.2. SURFACTANTES

Os surfactantes constituem uma importante classe de compostos químicos amplamente utilizados em vários setores da indústria moderna. Durante a década de 80 a procura por surfactantes aumentou aproximadamente 300% dentro da indústria química (GREEK, 1990) e sua produção no ano 2000 excedeu três milhões de toneladas por ano gerando quatro bilhões de dólares (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os surfactantes são agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface diminuindo a tensão superficial e interfacial dos líquidos. Eles contêm uma porção

hidrofóbica com pequena afinidade ao meio aquoso e um grupo hidrofílico que é fortemente atraído pelo meio aquoso (MULLIGAN, 2005).

Os tensoativos ou surfactantes, por possuírem uma parte polar e outra apolar (Figura 1), são também conhecidos como substâncias anfifílicas. A palavra anfifílica tem origem latina: *amphi* significa dualidade e *philos* significa atração. As substâncias tensoativas são classificadas em aniônicas (ex: éter sulfonado ou sulfatos), não iônicas ou anfóteras e catiônicas (ex: sais quaternários de amônio), de acordo com a carga exibida pela porção polar da molécula. A parte hidrofóbica é composta geralmente por um hidrocarboneto linear ou ramificado, apresentando ou não duplas ligações e/ou grupos aromáticos. Os íons têm uma forte afinidade pela água devido às atrações eletrostáticas entre a carga do íon e os dipolos da água. Além disso, são capazes de carregar longas cadeias carbônicas (parte apolar) para dentro da solução (MESQUITA, 2004; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; ROCHA, 1999; GEORGIU; LIN; SHARMA, 1992).

Em função da presença de grupos anfifílicos, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces fluídas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, a qual reduz a tensão superficial e interfacial, é responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes, como: detergência, emulsificação (micro e macro), lubrificação, ação espumante e antiespumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (LIN, 1996; NITSCHKE & PASTORE, 2002).

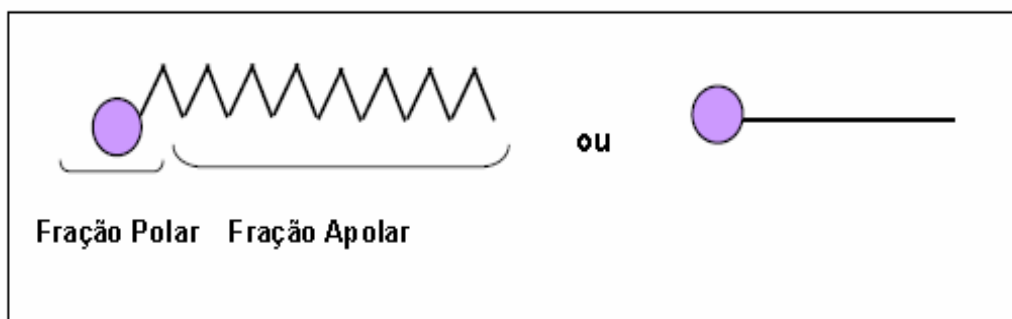


Figura 1. Molécula de tensoativo (surfactante).

As moléculas surfactantes possuem duas propriedades fundamentais:

- As moléculas saem da solução para se posicionar nas interfaces (ex: ar/líquido, líquido/líquido) com orientação específica - também conhecida como adsorção;
- Formam agregados orientados, também conhecidos como micelas. A formação de micelas em solução conferirá as propriedades de detergência e solubilização.

Numa solução em que a concentração de tensoativo é baixa, as moléculas existem na forma de monômeros, quando a concentração do tensoativo vai aumentando, os monômeros vão saturando a interface. Cada vez que uma nova molécula é adicionada à solução, vai aumentando a interação desfavorável entre a fração apolar e as moléculas de água até o ponto em que os monômeros vão-se agregando formando micelas. Nestas, a fração apolar está orientada para o centro da estrutura e a fração polar para o solvente. O tamanho da micela vai depender da natureza da parte apolar do tensoativo (Figura 2) (MESQUITA, 2004; LIN, 1996).

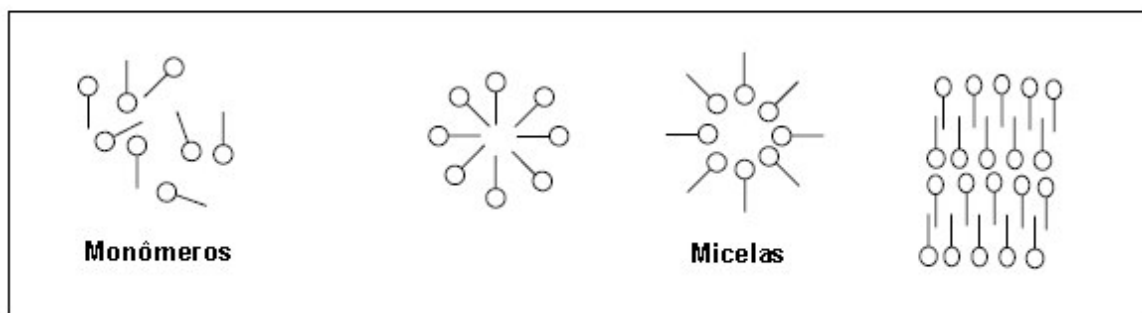


Figura 2. Organização das moléculas de tensoativos.

A divisão interfacial existente entre duas fases imiscíveis (sólido/líquido, líquido/líquido ou vapor/líquido) é devida ao fato de que a porção hidrofóbica está na superfície enquanto a porção hidrofílica é orientada em direção à solução (MULLIGAN, 2005). A concentração de tensoativos, na qual a termodinâmica do sistema tensoativo-solvente favorece a formação de micelas, é chamada de concentração micelar crítica (CMC). Em concentrações acima da CMC, o surfactante consegue aumentar a solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa, uma vez que o composto orgânico é incorporado no interior da micela (MESQUITA, 2004; MULLIGAN, 2005; LIN, 1996).

A eficácia de um surfactante é determinada pela sua capacidade de diminuir a tensão superficial, que é uma medida da energia superficial livre (entalpia da superfície livre) por unidade de área requerida para trazer a molécula para a superfície, ou seja, a força que age na superfície de um líquido promovendo a minimização da área superficial (ROSEN, 1978; MESQUITA, 2004; CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Devido à presença de um surfactante, requer-se pouco trabalho para trazer uma molécula para a superfície e, conseqüentemente, a tensão superficial é reduzida, pois esta pode levar a um aumento da concentração de compostos hidrofóbicos na

fase aquosa e isto é alcançado pela formação de uma emulsão e solubilização óleo/água acima da CMC (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

A tensão superficial está correlacionada com a concentração micelar crítica (Tabela 1). Surfactantes eficientes possuem uma baixa CMC, isto é, menor quantidade de surfactante é necessária para o decréscimo da tensão superficial (MULLIGAN, 2005).

Tanto os surfactantes sintéticos como os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água (72 mN/m) para valores na faixa entre 47 e 27 mN/m e a tensão interfacial (tensão entre líquido polar e não polar) como água em n-hexadecano de 40 para 1 mN/m (MULLIGAN, 2005; MESQUITA, 2004). Portanto a efetividade dos tensoativos está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais as quais devem atingir respectivamente valores menores que 30 e 1 mN/m (GOUVEIA *et al.*, 2003).

Tabela 1. Tensão superficial e concentração micelar crítica dos biossurfactantes e surfactantes sintéticos.

Natureza do surfactante	Surfactante	Tensão superficial (mN/m)	CMC (mg/L)
biológico	<i>Rhodococcus rubber</i> AC 235 - glicolípídeo	26,8	54
biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> - trealose dicorinomicolato	36	4
biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> - trealose tetraester	26	15
biológico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ramnolípídeo	29	50-200
biológico	<i>Torulopsis bombicola</i> - soforolípídeos	33	82
biológico	<i>Bacillus subtilis</i> - surfactina	27	23
sintético	Dodecil Sulfonato de Sódio (DSS)	37	2120
sintético	Brometo de Cetiltrimetilamônio	30	1300
sintético	Tween 20	30	600

mN/m = miliNewton/metro; fonte: MULLIGAN, 2005

A concentração micelar crítica varia na solução aquosa em função da estrutura do tensoativo, temperatura da solução, pH, presença de eletrólitos e compostos orgânicos. O tamanho da fração apolar da molécula de tensoativo é um fator importante e geralmente a CMC decresce com o aumento da hidrofobicidade da molécula isto é, quanto maior a cadeia carbônica da fração apolar do tensoativo, maior a tendência das moléculas de se adsorverem entre a interfase ar-água, diminuindo assim a tensão superficial da solução (MESQUITA, 2004).

A Figura 3 mostra os parâmetros que variam em função da concentração de surfactante (tensoativo).

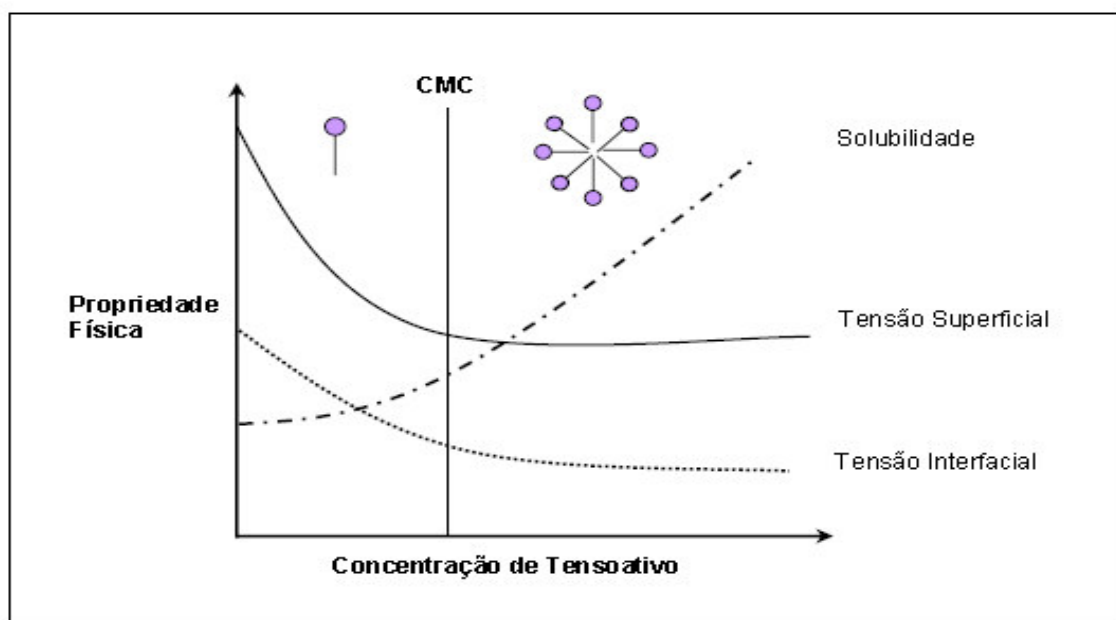


Figura 3. Diagrama da variação de tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com relação a concentração de tensoativo.

Os tensoativos que se adsorvem nas interfaces sólido/água e óleo/água são os melhores detergentes (MESQUITA, 2004). Alguns estudos têm relatado que os surfactantes podem aumentar a desorção e disponibilidade de poluentes orgânicos aos microrganismos degradativos (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Uma característica importante dos surfactantes está relacionada à abundância relativa das frações polares e apolares. Os surfactantes podem ser classificados de

acordo com o balanço hidrofílico-hidrofóbico (HLB), pois essa relação afeta as propriedades físico-químicas das moléculas. O valor de HLB é uma indicação da solubilidade no óleo ou na água da solução e, quanto menor o valor de HLB maior é a solubilidade no óleo da solução. Em geral, as moléculas com baixo HLB são lipofílicas, enquanto as de HLB alto são mais solúveis em água. A Tabela 2 apresenta o emprego de surfactantes não-iônicos de acordo com os valores de HLB (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; ROCHA, 1999).

Segundo Gouveia *et al.* (2003), surfactantes com HLB menor que 6 são mais solúveis na fase oleosa, enquanto valores entre 10 e 18 exibem características opostas.

Tabela 2. Diferentes valores de balanço hidrofílico-lipofílico para surfactantes não-iônicos.

HLB	Usos
< 3	Filmes de superfície
3-6	Emulsificantes água em óleo
7-9	Espalhamento de líquidos em superfícies sólidas
8-15	Emulsificantes óleo em água
13-15	Detergentes
15-18	Solubilizantes

O espalhamento da água sobre uma superfície sólida hidrofóbica pode ser melhorado pela ação de agentes tensoativos. A maior parte dos contaminantes orgânicos é hidrofóbica, logo a sua remoção da matriz do solo deve ser considerada um fenômeno do ângulo de contato θ . A adição de tensoativos reduz este ângulo de contato na interface tripla solo/composto orgânico/água; como resultado o composto orgânico se enrola podendo facilmente ser separado (Figura 4).

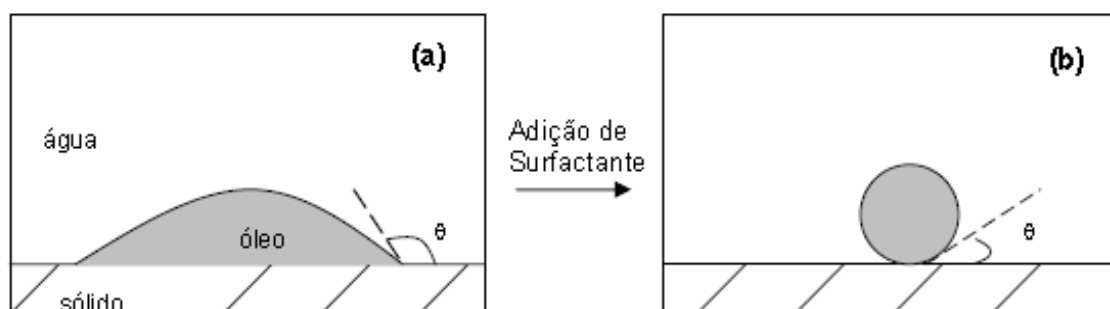


Figura 4. Comportamento de composto orgânico antes (a) e após (b) adição de tensoativo.

A CMC do tensoativo é menor na água intersticial que na água pura, pois a presença de sais dissolvidos na água aumenta a força iônica da solução. Contudo este fenômeno provoca o aumento da adsorção do tensoativo na superfície do solo, fazendo com que uma quantidade maior de tensoativo seja adicionada ao solo para atingir a CMC (MESQUITA, 2004).

O grau de associação de poluentes orgânicos e inorgânicos é governado por uma complexa interação físico-química nas interfaces, esta associação envolve adsorção entre os constituintes do solo, seqüestrados pela matriz do solo (microporos) e particionados na fase líquida não aquosa (NAPL) que controla o destino da contaminação. A NAPL representa substâncias orgânicas que são relativamente insolúveis em água sendo uma fonte de poluição (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002). A solubilização das NAPLs é um fenômeno que está diretamente ligado à formação de micelas.

As áreas contaminadas representam uma ameaça ambiental, principalmente as grandes áreas industriais. Por essa razão, muitas técnicas de descontaminação foram desenvolvidas ao longo dos anos. Mais recentemente, os tensoativos têm sido empregados nos processos de lavagem de solo para remoção de NAPLs. Uma das grandes vantagens da utilização dessa técnica é o aumento da solubilidade das NAPLs, acelerando o processo de biodegradação (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). Muitos fatores podem influenciar na eficiência desta lavagem com tensoativos. Entre elas estão: a dureza da água subterrânea, adsorção em argilas e biodegradabilidade muito alta. Esta última pode anular o efeito do tensoativo, embora o fator biodegradabilidade seja importante para evitar acúmulo no solo.

Os principais fatores que devem ser considerados na escolha de um tensoativo na lavagem de solo são: eficiência na remoção do contaminante, custo, biodegradabilidade do composto e dos produtos de degradação, baixa dispersão no solo, efeitos tóxicos em seres humanos, animais e plantas e reciclagem. Todos esses devem ser estabelecidos previamente em laboratório antes de serem executados ensaios de campo (MESQUITA, 2004).

Para reduzir o risco de contaminação, são usados tensoativos grau alimentar (TMAZ, DOWFAX, Aerossol, Tween), todos aprovados pelo “Food and Drug Administration” (FDA). A aprovação pelo FDA, contudo, não garante que o tensoativo ou os produtos de degradação sejam seguros e dentro dos padrões da legislação (BOVING & BRUSSEAU, 2000).

A baixa solubilidade em água e alta tensão interfacial na água são duas características principais comumente encontradas nos contaminantes orgânicos do solo. Esses fatores diminuem a eficiência da remediação *in situ*. Para resolver este problema, podem ser usados diferentes surfactantes e, desta forma, aumentar a taxa de remediação. Estes atuam sob dois mecanismos: primeiro reduzem a tensão interfacial entre a água e os contaminantes e segundo, são capazes de formar agregados conhecidos como micelas que solubilizam os compostos orgânicos hidrofóbicos. Estes surfactantes também são ingredientes importantes para misturas primárias de emulsificantes usados para manutenção de emulsões de polímeros, estabilização de látex de polímeros e emulsificantes para emulsões agrícolas (MULLIGAN & EFTEKHARI, 2003).

A eficiência da biodegradação de compostos oleosos tem sido limitada pela fraca transferência de massa devido a alta hidrofobicidade destes compostos, conduzindo a uma baixa solubilidade aquosa. Para aumentar sua biodegradação usam-se surfactantes, os quais têm papel crucial para facilitar a biorremediação, pois estes aumentam a solubilidade dos óleos em água aumentando a biodisponibilidade destas substâncias hidrofóbicas, conduzindo para o aumento da taxa de degradação dos óleos. Entretanto, surfactantes sintéticos não são apropriados para aplicações em biorremediação, pois podem causar efeitos tóxicos ao meio ambiente ou resultar em uma poluição secundária. Os biosurfactantes por não afetarem o meio ambiente são uma alternativa aos surfactantes sintéticos convencionais (WEI; CHOU; CHANG, 2005).

Várias técnicas foram desenvolvidas e implementadas para a remediação do solo e sedimentos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Contudo, a remoção de compostos hidrofóbicos com baixa volatilidade e metais ligados ao solo é ainda o maior problema. Uma solução potencial para a remediação do solo contaminado por petróleo e metal é o emprego de surfactantes, os quais solubilizam e dispersam os contaminantes, limpando o solo, retornando-o a seu estado original (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 1999).

A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é sintetizada a partir de derivados do petróleo, entretanto, o interesse por surfactantes de origem microbiana tem aumentado significativamente em decorrência de serem naturalmente biodegradáveis diminuindo assim o impacto ambiental, ou seja, possuem características amigáveis ao meio ambiente e ocorrem naturalmente no solo, além de

terem aplicações potenciais em diferentes setores industriais, como formulações farmacêuticas e cosméticas, petroquímica e produtos alimentícios e nas áreas de proteção ao meio ambiente (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; FIECHTER, 1992; RUFINO; LUNA; SARUBBO, 2003, BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os surfactantes produzidos a partir do petróleo requerem síntese e várias etapas de purificação, tornando-se um processo de alto custo, além do que novas aplicações aumentaram a sua demanda no mundo. A possibilidade do uso de agentes mobilizantes de poluentes mais biocompatíveis que os surfactantes químicos comerciais torna atrativo o uso dos surfactantes produzidos por microrganismos (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998; BERSELLI *et al.*, 2006).

Sabendo que, os surfactantes precisam ter uma afinidade elevada para óleos e poderem formar emulsões óleo/água estáveis para aplicações como líquidos de limpeza para remoção eficaz de resíduos oleosos em tanques de armazenamento e processos de limpeza em superfícies metálicas, também é desejável que tais surfactantes sejam produzidos por recursos renováveis, com baixa ou nenhuma toxicidade e biodegradáveis, pois os fatores ambientais são os principais guias dos fabricantes que estão em busca de processos “verdes” com grande destaque aos biossurfactantes (ZHANG *et al.*, 1999).

3.3. BIOSSURFACTANTES

Os componentes microbianos que exibem alta atividade de superfície e atividade emulsificante são classificados como biossurfactantes. Estes podem ser sintetizados como produtos metabólicos por diferentes microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos utilizando vários substratos de baixo custo incluindo açúcares, óleos, alcanos, resíduos industriais e agrícolas. Os biossurfactantes podem ser obtidos por procedimentos relativamente simples como, por exemplo, processos fermentativos e podem apresentar estruturas químicas diversas (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; RUFINO; LUNA; SARUBBO, 2003, MESQUITA, 2004; HABA *et al.*, 2000). Em geral, os biossurfactantes que atuam como emulsificantes são agentes que auxiliam na dispersão de um líquido em outro, como óleo em água. Estes bioemulsificantes podem ser divididos em

moléculas de baixo peso molecular que reduzem a tensão interfacial e polímeros de alto peso molecular como o bioemulsan, o qual auxilia na formação de emulsões (ROSENBERG & RON, 1997, 1999). Um grande número de espécies bacterianas de diferentes gêneros produz bioemulsificantes. Esta propriedade é particularmente comum entre microrganismos que degradam compostos hidrofóbicos insolúveis em água como o petróleo. Os bioemulsificantes são usados para melhorar a recuperação de óleo nos derrames no mar e remediação de solos por poluição com óleo, além de apresentarem também atividade antimicrobiana como, por exemplo, a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* (TOREN *et al.*, 2002).

As moléculas anfifílicas são a espinha dorsal das membranas celulares, garantindo o transporte e a troca de material na célula. Nas células de organismos superiores as lecitinas e o ácido glicólico são os compostos mais conhecidos. Nos microrganismos são os fosfolipídeos, glicolipídeos, lipopeptídeos e lipopolissacarídeos. Como estrutura molecular eles possuem uma fração polar (mono, oligo ou polissacarídeo, ou proteínas) e uma fração apolar (ácido graxo hidroxilado e álcoois graxos que podem ser saturados ou insaturados).

Muitas vezes os microrganismos produzem substâncias anfifílicas que são lançadas para fora da célula, a fim de facilitar a entrada de compostos pela membrana celular ou para aumentar a biodisponibilidade de um substrato no meio. Também existem situações em que a produção de biossurfactantes está associada à interação das células com superfícies sólidas (SHAFI & KHANNA, 1995).

Em geral, a estrutura dos biossurfactantes inclui uma porção hidrofílica que consiste de aminoácidos, peptídeos, ânions ou cátions; mono, di ou polissacarídeos e uma porção hidrofóbica consistindo de ácidos graxos saturados ou insaturados (SINGH & CAMEOTRA, 2004). Biossurfactantes produzidos por microrganismos procariontes ou eucariontes possuem diversas estruturas químicas que podem ter baixo ou alto peso molecular. Os de baixo peso molecular são geralmente glicolipídeos contendo os açúcares ramnose, sofrorose e trealose e lipopeptídeos que consistem de polipeptídios curtos e os de alto peso molecular como os biopolímeros que incluem lipoproteínas, complexos lipopolissacarídeo-proteína e complexos polissacarídeo-proteínas-ácidos graxos. Os biossurfactantes de alto peso molecular estão associados à produção de emulsão (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002; RON & ROSENBERG, 2002, LANG, 2002; SULLIVAN, 1998).

A classificação dos surfactantes sintéticos tem como base os grupamentos polares, já os biossurfactantes são classificados com base na natureza bioquímica do composto e podem ser classificados em cinco categorias segundo, Mesquita (2004) e Reis (1998):

- Glicolipídeos: são geralmente carboidratos combinados com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos alifáticos hidroxilados (ex: trealolipídeos, soforolipídeos e ramnolipídeo). Eles estão envolvidos na entrada de hidrocarbonetos de baixa polaridade em células microbianas;
- Lipossacarídeos: um exemplo desse tipo de bioemulsificante extracelular é o emulsan com alto peso molecular e solúvel em água produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*;
- Lipopeptídeos: são bastante eficazes na redução de tensão superficial e interfacial; a surfactina, produzida pela *Bacillus subtilis*, é o biossurfactante mais potente já relatado;
- Fosfolipídeos: embora estejam presentes em todos os microrganismos, existem poucos exemplos de produção extracelular. Os mais conhecidos são produzidos por *Corynebacterium lepus*;
- Ácidos graxos e lipídeos neutros: são proteínas hidrofóbicas, como o ácido ustilágico e os ácidos corinomicólicos.

Há uma grande preocupação mundial relacionada à liberação de hidrocarbonetos no ambiente decorrente da atividade industrial e do derrame acidental de óleo e seus componentes relacionados. Os biossurfactantes com estrutura anfipática atuam sobre os hidrocarbonetos emulsificando-os por meio da formação de micelas, que se acumulam na interface entre líquidos de diferentes polaridades. Isto disponibiliza poluentes hidrofóbicos do solo como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e conferem a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (KUIPER *et al.*, 2004; DESAI & BANAT, 1997, BICCA; FLECK; AYUB, 1999).

Os biossurfactante, por serem biodegradáveis na água e no solo, são superiores aos surfactantes de origem química, demonstrando uma variedade de aplicações potenciais incluindo aumento da recuperação de petróleo, auxílio da biorremediação de poluentes insolúveis em água (organismos e metais), facilidade em processos industriais (emulsificação, separação de fases, estabilização de emulsão, formação de espuma, molhabilidade e redução da viscosidade), aumento do

transporte de bactérias, aditivos em cosméticos e controle biológico (SULLIVAN, 1998; LIN, 1996; POREMBA *et al.*, 1992; BODOUR & MILLER-MAIER, 1998).

Os biossurfactantes devido à sua diversidade, quando comparados com os surfactantes químicos convencionais possuem as seguintes vantagens: baixa toxicidade (Tabela 3), baixa CMC; alta biodegradabilidade, maior habilidade para complexar metais pesados, melhor compatibilidade ao meio ambiente, melhor capacidade espumante, alta seletividade e atividade específica em extremos de temperatura, pH e força iônica (ou seja, menos sensíveis a ambientes extremos), atividade antibiótica, emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos; características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência; além de poder ser sintetizados a partir de substratos renováveis e terem a possibilidade de produção em grande escala, fator importante à medida que o preço do petróleo aumenta. Assim os biossurfactantes estão assumindo grande importância sobre os surfactantes químicos (KIM *et al.*, 2000; JENNINGS & TANNER, 2000; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; NITSCHKE & PASTORE, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002b; LIN, 1996; POREMBA *et al.*, 1992; HUDAK & CASSIDY, 2004).

Tabela 3. Toxicidade dos biossurfactantes comparada aos surfactantes sintéticos.

Natureza do surfactante	Surfactante	*CE ₅₀ (mg/L)
biológico	<i>Rhodococcus rubber</i> AC 235 - glicolípídeo	650
biológico	<i>Rhodococcus erythropolis</i> - trealose dicorinomicolato	49
biológico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - ramnolípídeo	50
sintético	Acetato de nonilfenol - (óxido de etileno) ₉ (EQ9)	78
sintético	Estearato de sacarose (DK50)	67
sintético	Finasol OSR-5	7
sintético	Inipol EAP 22	0,004

*CE₅₀ - concentração efetiva onde 50% dos microrganismos morrem.

Os hidrocarbonetos de petróleo continuam sendo usados como principal fonte de energia e daí um importante poluente global do meio ambiente. Tirando os acidentes de contaminação do ecossistema, a vasta quantia de lamas de óleo geradas em refinarias em sistemas de separação água-óleo e a acumulação e desperdício de materiais engordurados com óleo cru estocados em tanques causam um grande problema devido aos métodos caros disponíveis para sua remoção (RAHMAN *et al.*, 2003a). Os biossurfactantes aumentam a emulsificação de hidrocarbonetos, possuem potencial para solubilizar hidrocarbonetos contaminantes e aumentar sua disponibilidade aos microrganismos degradativos (RAHMAN *et al.*, 2002b).

A biorremediação do petróleo pode ser realizada por microrganismos capazes de utilizarem hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono; esses microrganismos são encontrados na natureza e podem degradar vários tipos de hidrocarbonetos de cadeia curta, cadeia longa e inúmeros compostos aromáticos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de baixa solubilidade em água (RON & ROSENBERG, 2002).

A contaminação marinha com hidrocarbonetos derivados de petróleo pode causar perigo ao meio ambiente e problemas à saúde. Felizmente alguns gêneros de bactérias degradantes de hidrocarbonetos produzem biossurfactantes que podem emulsificar misturas água-hidrocarbonetos o qual também possibilita seu crescimento em óleo. Esta propriedade emulsificante demonstra o aumento da degradação de hidrocarbonetos no meio ambiente, sendo uma ferramenta potencial para o controle da poluição ambiental causada por derramamento de óleo (KREPSKY *et al.*, 2007).

A contaminação acidental do solo com petróleo ocorre frequentemente devido ao aumento de seu uso e demanda de seus produtos como óleo diesel. Diferentes técnicas estão disponíveis para a remediação do solo contaminado como, por exemplo, a biorremediação com a aplicação de processos ou agentes microbiológicos (MATHEW *et al.*, 2006, MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2005).

Os vazamentos de óleo constantes e os resíduos industriais derivados de petróleo conduziram, nas últimas décadas, a um aumento na atividade de pesquisa em biodegradação de petróleo bruto, diesel e outros derivados que são desperdiçados. As companhias envolvidas têm interesse não só em encontrar maneiras biológicas efetivas para a degradação do petróleo bruto e de seus derivados, mas também para a fluidificação e recuperação de quantias significativas de hidrocarbonetos por meio de

processos de emulsificação e desmemulsificação em sistemas de óleo/água. Igualmente importante é a procura por estratégias biológicas focalizadas na melhoria da qualidade dos derivados do petróleo (diesel, gasolina) com a adição de agentes naturais de emulsificação. Os biossurfactantes promovem condições apropriadas para a degradação, dispersão e emulsificação dos hidrocarbonetos, aumentam a recuperação do petróleo pela alteração das características físico-químicas, facilitando assim sua recuperação (PERFUMO; CANGANELLA; MANNA, 2003).

Devido à natureza extremamente tóxica em concentrações traços e a não-biodegradabilidade dos poluentes orgânicos, metais pesados são uma ameaça persistente ao meio ambiente. Resíduos de metais são produzidos por numerosas atividades industriais: mineração, produção de baterias automobilísticas, emissão de veículos, desperdício industrial, cinzas que voam nos processos de incineração, aparelhos eletrônicos e outras manufaturas como pinturas, tubulações metálicas e munição. Os biossurfactantes são usados para a remoção de metais pesados, pois eles são capazes de formar biofilmes que absorvem e removem estes compostos promovendo assim a biorremediação (SINGH & CAMEOTRA, 2004, HONG; TOKUNAGA; KAJIUCHI, 2002; LE CLAINCHE *et al.*, 2006; BRAUD *et al.*, 2006).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), como o naftaleno, são considerados um grande perigo ao ecossistema terrestre e marinho por apresentarem propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, que podem interagir com metais também presentes nestes sistemas. Muitas vezes, microrganismos capazes de biodegradar estes compostos têm sua eficiência diminuída pela baixa solubilidade destas substâncias, no meio onde estão presentes. Para aumentar a biodegradação, tem sido observado que os biossurfactantes são capazes de solubilizar e conseqüentemente disponibilizar estes PAHs para os microrganismos degradativos (MARÇANO; VALDMAN; LEITE, 2003; RON & ROSENBERG, 2002; PRABHU & PHASE, 2003, PALA, 2002; VOLKERING *et al.*, 1995; STRELEC *et al.*, 2003).

Para a remediação de solos contaminados é necessária a adição de agentes químicos, tais como surfactantes, os quais atuam na mobilidade ou aumentam a disponibilidade de tais contaminantes. Biossurfactantes possuem vantagens comparadas aos sintéticos para uso na biorremediação do solo, pois estes são compostos naturais que apresentam baixo impacto ao meio ambiente e são

biodegradáveis (NOORDMAN *et al.*, 1998; TORRENS; HERMAN; MILLER-MAIER, 1998).

A produção dos tensoativos biológicos não é economicamente vantajosa, quando comparada com os equivalentes sintéticos, daí a aposta em substratos mais baratos, como os resíduos agro-industriais (ROCHA, 1999). Os biossurfactantes têm a vantagem de serem biodegradáveis e sua produção pode ser realizada utilizando substratos de recursos renováveis e microrganismos; podendo eventualmente substituir os obtidos quimicamente (FIECHTER, 1992).

A recuperação e concentração do biossurfactante do meio de cultura é que vão determinar a viabilidade da produção em grande escala. Geralmente a baixa concentração e a estrutura do biossurfactante limitam a extração. Diferentes métodos são utilizados nos processos de isolamento como a ultrafiltração, ultracentrifugação, precipitação com ácido ou sal, extração por solvente e adsorção em cromatografia. Uma grande variedade de solventes (ex: metanol, etanol, éter etílico, acetona, clorofórmio, diclorometano) tem sido usada na forma pura ou combinada nos processos de extração. As misturas mais efetivas são aquelas que utilizam clorofórmio e metanol, que facilitam no ajuste de polaridade da molécula que se pretende extrair. Contudo, o uso destas substâncias em grande escala demanda grandes volumes de solvente o que torna o processo caro e por outro lado, gera resíduos clorados (KIM *et al.*, 1997; KUYUKINA; IVSHINA; PHILP, 2001).

Devido ao alto custo dos processos de remediação e outras aplicações potenciais, é necessário, e inevitável, aumentar o rendimento do biossurfactante. Entretanto, o potencial para a produção de biossurfactante é determinado pela origem do microrganismo, além de outros fatores como condições ambientais e a natureza do substrato que também influenciam no nível de expressão. A otimização dessas condições pode levar a uma alta e segura produção de biossurfactante (RAHMAN *et al.*, 2002a).

Óleo diesel é uma excelente fonte para se estudar a biodegradação de hidrocarboneto. O Brasil é um produtor e consumidor em grande escala de óleo diesel e este tem sido várias vezes reportado em problemas de poluição no meio ambiente devido ao seu uso extensivo como combustível (BICCA; FLECK; AYUB, 1999).

Diversos óleos derivados de plantas nativas como babaçu, andiroba, cupuaçu e buriti podem ser utilizados como fonte de carbono para obtenção de

biossurfactante. Costa *et al.* (2006), relataram a obtenção de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando óleos de plantas nativas como substrato.

O sucesso para produção de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos baratos e o uso de matérias-primas de baixo custo o qual diminui de 10-30% o custo total do processo. Açúcares e óleos são fontes de carbono adequadas para a produção de biossurfactantes ecologicamente seguros e com boas propriedades surfactantes (SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006).

Os biossurfactantes são atualmente mais caros que seus sintéticos equivalentes, mas seu potencial para produção *in solo* por espécies nativas pode reduzir o custo comparado com biossurfactantes comprados ou cultivados em bioreatores, particularmente solos contaminados por hidrocarbonetos ou a adição de resíduos podem ser utilizados como substrato para o cultivo (HUDAK & CASSIDY, 2004). Resíduos agroindustriais com alto conteúdo de carboidratos e lipídeos são necessários para o uso como substratos na produção de biossurfactantes (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

O interesse na produção de surfactantes microbianos tem permitido o desenvolvimento de métodos quantitativos e qualitativos rápidos e eficientes para seleção e análise de organismos produtores de biossurfactantes (BODOUR & MILLER-MAIER, 1998).

O comportamento dos biossurfactantes pode ser observado pela análise de dados da tensão superficial e interfacial provenientes das características do caldo, do sobrenadante livre de células e do produto cru e puro após a extração (LANG & PHILP, 1998).

As medidas de tensão superficial são comumente usadas para monitorar o crescimento microbiano e existe uma grande quantidade de informações na literatura sobre tensão superficial e propriedades de emulsificação para alguns microrganismos. Contudo, é difícil comparar os dados publicados para um microrganismo específico, pois o crescimento e a produção de surfactante estão associados ao meio de cultura, pH, fonte de carbono e aeração. Um dos fatores que controlam a produção de biossurfactante é a quantidade da fonte de carbono (solúvel em água, hidrocarbonetos ou óleos) e nitrogênio (NH_4^+ , NO_3^- , uréia ou aminoácido) no meio de cultura ou ambiente natural (MESQUITA, 2004).

As bactérias podem ser facilmente isoladas de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo e, provavelmente, algumas delas serão capazes de

produzir surfactantes. No isolamento utilizam-se hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos como única fonte de carbono mineral, estudos revelaram que um grande número de microrganismos isolados por esta técnica, como as espécies de *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e outros gêneros capazes de produzir biossurfactantes (ROY; KOMMALAPATI; MANDAVA, 1997; BARKAY *et al.*, 1999; CHRISTOFI & IVISHINA, 2002, SULLIVAN, 1998).

Outras vantagens dos biossurfactantes incluem: diversidade estrutural que pode ligar a propriedades únicas, a possibilidade de custo-efetivo em produção *ex situ* ou talvez uniforme em produção *in situ* e biodegradabilidade, essas propriedades fazem do biossurfactante uma escolha promissora para aplicação no meio ambiente (HUA *et al.*, 2003).

A adição de hidrocarbonetos no ecossistema pode resultar em um aumento seletivo de microrganismos capazes de utilizar os hidrocarbonetos como produtos metabólicos (RAHMAN *et al.*, 2002b). A literatura indica que as bactérias das famílias Pseudomonadacea e Bacillacea são muito eficientes na remoção de petróleo e seus derivados poluentes na água (CYBULSKI *et al.*, 2003).

3.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES

Com muita frequência, a análise do solo está relacionada com o isolamento e identificação de tipos fisiológicos específicos de microrganismos, bem como, com a caracterização e a detecção de sua atividade (LYNCH, 1986). Microrganismos produtores de biossurfactantes podem ser isolados de solos contaminados por hidrocarbonetos e por bactérias de ecossistema marinho (COELHO *et al.*, 2003; JENNINGS & TANNER, 2000). Microrganismos isolados de materiais não contaminados também podem ser capazes de produzir moléculas com propriedades anfífilas. Desta forma, é necessário de um maior conhecimento da fisiologia, genética e bioquímica dos microrganismos produtores de biossurfactantes (FIECHTER, 1992).

Segundo Georgiou; Lin; Sharma (1992), uma grande variedade de microrganismos produz biossurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade do biossurfactante são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons no meio de cultura, além das condições de cultivo.

Bactérias produtoras de surfactantes incluem: *Pseudomonas aeruginosa* (mono- di-ramnolipídeos), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeos glicolipídeos, etc.) *Bacillus subtilis* (surfactina), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipídeos sucrose). Fungos envolvidos na produção de surfactantes incluem as leveduras *Torulopsis* sp (soforolipídeos) e *Candida* sp (liposan e fosfolipídeos) (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Os microrganismos produtores de biossurfactantes mais conhecidos estão listados na Tabela 4, assim como alguns exemplos das estruturas estão apresentados na Figura 5.

Tabela 4. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipos de Biossurfactantes	Microrganismos
Glicolipídeos	
- ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa, Bacillus sp</i>
- soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola, T. apícola</i>
- trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
- Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

- Ornitina	<i>Pseudomonas sp</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos Graxos, lipídeos neutros, e fosfolipídeos	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis, Clostridium sp</i>
- Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida tropicalis</i>
- Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
- carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>

Ácidos corinemicólicos
Surfactantes particulados
- vesículas

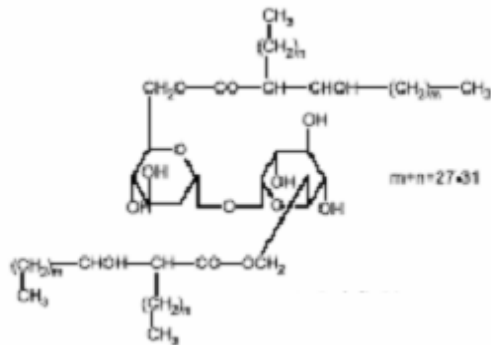
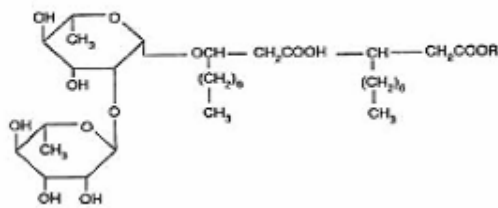
Corynebacterium sp

Acinetobacter calcoaceticus

- células

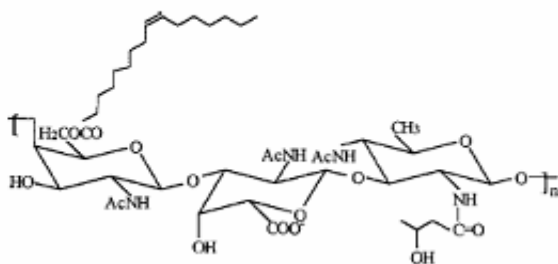
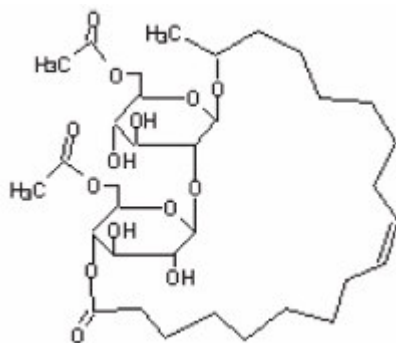
Várias bactérias

NITSCHKE & PASTORE (2002)



ramnolipídeo (a)

trealose-lipídeo (b)



soforolípídeo (c)

emulsan (d)

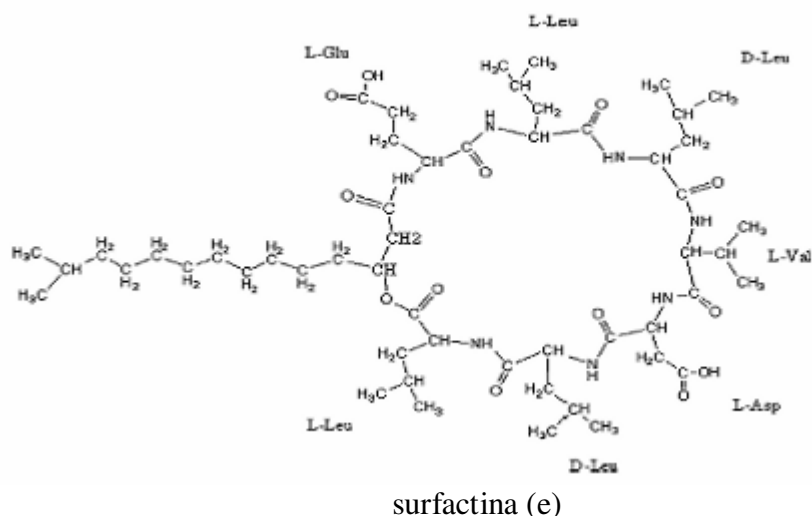


Figura 5. Estruturas químicas de alguns biossurfactantes produzidos por: (a) *Pseudomonas aeruginosa*, (b) *Rhodococcus erythropolis* (c) *Candida bombicola* (d) *Acinetobacter calcoaceticus* e (e) *Bacillus subtilis*.

Um estudo intensivo de grupos de biossurfactantes mostrou que os glicolípídeos, como os ramnolípídeos produzidos por *Pseudomonas* são os mais representativos. Lipopeptídeos formam outro importante grupo de biossurfactantes, que são produzidos por membros do gênero *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Pseudomonas* (KUIPER *et al.*, 2004) e os soforolípídeos (SLPs) são produzidos por *Candida bombicola*, *apicola* e *bogorensis*. Estudos realizados por Hua; Chen; Lun (1998), mostraram que uma linhagem de *Candida antarctica* foi capaz de produzir um biossurfactante utilizando como substrato diferentes hidrocarbonetos e a sua produção foi acompanhada quanto a capacidade de reduzir a tensão superficial sendo este biossurfactante chamado BS-UC. Outra espécie, a *Candida lipolytica*, produziu um biossurfactante extracelular com atividade de emulsificação, pela fermentação do óleo de babaçu e glicose como fontes de carbono (VANCE-HARROP; GUSMÃO; CAMPOS-TAKAKI, 2003; LANG, 2002; HUA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2002).

Do ponto de vista ecológico, os soforolípídeos oferecem vantagens significativas em relação aos detergentes tradicionais produzidos quimicamente, pois nenhum produto químico perigoso tal como o óxido do etileno é envolvido, nem mesmo alta temperatura ou pressão são requeridos durante a produção e o processo inteiro é baseado em materiais recicláveis. Além disso, os soforolípídeos demonstraram ser prontos e inteiramente biodegradáveis, não tóxicos ao meio aquático e com potencial para uso em formulações de lavagem e de limpeza (FLEURACKERS, 2006).

O gênero *Bacillus* sp pode produzir surfactantes lipoprotéicos como iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina, bacilomicina e surfactina, os quais possuem atividades antibióticas (BARROS *et al.*, 2007).

Bacillus subtilis, uma bactéria comum de solo, produz um biossurfactante lipopeptídeo cíclico conhecido como surfactina. A surfactina possui uma estrutura

anfílica associada com uma alta atividade surfactante e tem a propriedade biológica de afetar tumores, bactérias, fungos, vírus e micoplasmas, além de apresentar baixa CMC e alto poder de redução da tensão superficial (VOLLENBROICH *et al.*, 1997; QUEIROGA; NASCIMENTO; SERRA, 2003; LANG, 2002; BARROS *et al.*, 2007).

Os ramnolipídeos são formados por uma ou duas moléculas de ramnose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico e são produzidos por *Pseudomonas* (DESAI & BANAT, 1997; HABA *et al.*, 2003) (Figura 5). Ramnolipídeos são biosurfactantes que reduzem a tensão superficial, estabilizam emulsões, promovem a formação de espumas, são geralmente não-tóxicos, biodegradáveis e também possuem atividade anti-fúngica. Além disso a ramnose do ramnolipídeo pode ser usada como transporte de drogas insolúveis em humanos e ainda, agir como um precursor para componentes de flavor de alta qualidade (RAHMAN *et al.*, 2002a). *Pseudomonas aeruginosa* produz um glicolipídeo extracelular que atua como agente solubilizante de compostos hidrofóbicos como os alcanos e também apresenta eficiência na remoção de metais pesados por complexação (DÉZIEL *et al.*, 2003; LANG & PHILP, 1998; BRAUD *et al.*, 2006). Este ramnolipídeo tem sido aplicado em várias indústrias e processos de biorremediação devido a sua alta atividade emulsificante e sua atuação na redução da tensão superficial (reduz a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m) (WEI; CHOU; CHANG, 2005) e tem sido estudado por seu potencial para lavagem do solo (MAIER & SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). *Pseudomonas putida* produz este mesmo bioemulsificante com alta atividade emulsificante (BONILLA *et al.*, 2005; LANG, 2002).

Os ramnolipídeos podem servir como fonte de ramnose, um produto químico fino produzido comercialmente pela extração de plantas como o carvalho. O processo emprega produtos químicos tóxicos, corrosivos e gera quantidades grandes de resíduos aromáticos perigosos. Os ramnolipídeos produzidos por fermentação podem ser facilmente hidrolisados para a obtenção da ramnose sendo uma alternativa amigável ao meio ambiente (CHAYABUTRA; WU; JU, 2001).

Lipopeptídeos (viscosina) produzidos por *Pseudomonas fluorescens*, são agentes de biocontrole de fungos fitopatógenos ou fitotóxicos (LANG, 2002; KUIPER *et al.*, 2004).

O gênero *Rhodococcus* é capaz de transformar, biodegradar ou utilizar como fontes de carbono vários compostos hidrofóbicos (hidrocarbonetos, esteróides, lignina, etc.), produzindo glicolipídeos contendo trealose como carboidrato. Seu biosurfactante tem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial a níveis observados nos surfactantes sintéticos, além de possuir baixa CMC. Esta capacidade pode ser comercial e industrialmente importante. *Rhodococcus erythropolis* produz glicolipídeos com propriedades antiviral e antifúngica (BICCA; FLECK; AYUB, 1999; LANG & PHILP, 1998).

Espécies de *Acinetobacter* produzem biosurfactantes, entre eles se destacam o emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*, e o alasan, produzido por *Acinetobacter radioresistens*, os quais são polissacarídeos de alto peso molecular que atuam como bioemulsificantes (RON & ROSENBERG, 2002; LANG, 2002).

O emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* é um lipoheteropolissacarídeo aniônico que devido aos seus grupos hidrofóbicos é de extremo interesse como agente emulsificante podendo remover resíduos oleosos e

estabilizar em 70% emulsões óleo/água de lavagem em oleodutos (ZHANG *et al.*, 1999).

Linhagens de *Penicillium citrinum* (fungo filamentoso) são capazes de produzir uma lipase extracelular (glicolípido) com propriedades emulsificantes (CAMARGO - DE - MORAIS *et al.*, 2003).

Foi relatado que lipopeptídeos produzidos por *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* atuam na adesão das bactérias às superfícies. Esta adesão é essencial para o desenvolvimento e manutenção do biofilme bacteriano. A formação deste biofilme bacteriano é perigoso na área médica e na limpeza de equipamentos tornando-se um problema importante, especialmente, aquelas bactérias nas quais os biofilmes são altamente resistentes a antibióticos (KUIPER *et al.*, 2004).

Espécies de *Microbacterium* produzem um glicoglicerolípido que possui a propriedade de diminuir a tensão interfacial e superficial podendo ter aplicação em processos de biorremediação do solo.

Nocardia sp produz dois biossurfactantes quando cultivadas em n-hexadecano, o tipo I tem uma grande capacidade como agente emulsificante e o tipo II reduz a tensão superficial da água a 28 mN/m (LANG, 2002).

A levedura *Pseudozyma fusiformata* produz um biossurfactante termoestável de baixo peso celular com propriedade fungicida (LANG, 2002).

Macrocystis pyrifera e *Azotobacter vinelandii* produzem heteropolissacarídeos usados como dispersantes na indústria de processamento de cerâmica.

Biossurfactantes eficientes para a desorção de poluentes hidrofóbicos do solo podem ser obtidos por uma variedade de microrganismos como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus erythropolis*. Este último, pode produzir material biofloculante que causa floculação eficiente de suspensões sólidas (LANG & PHILP, 1998).

A manoproteína produzida por *Saccharomyces cerevisiae* pode estabilizar emulsões água/óleo para a produção de maionese, biscoitos, bolos, produtos cárneos (salsichas), sorvetes e outros e a parede celular de *Saccharomyces uvarum* hidrolisada e liofilizada é utilizada em margarinas (BARROS *et al.*, 2007).

3.5. APLICAÇÕES DOS BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes ou substâncias tensoativas dividem preferencialmente a interfase entre fluídos com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio tais

como óleo/água ou ar/água interfacial. Estas propriedades rendem a estes, a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e formam microemulsões nas quais os hidrocarbonetos podem solubilizar-se em água ou a água solubilizar-se em hidrocarbonetos. Portanto, estes podem ser utilizados em várias atividades industriais que envolvam o uso de surfactantes sintetizados quimicamente como: a indústria de petróleo, farmacêutica, médica, de cosméticos, na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, processamento de alimentos (textura), tratamento e processamento de metais, vestuário, processamento de polpas de papel, indústria de tinta, emulsões e floculação (ANISZEWSKI *et al.*, 2003; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Devido as suas propriedades físico-químicas, os biossurfactantes são mais adequados que a maioria dos surfactantes sintéticos para uso na indústria petroquímica, o que explica porque a maior parte da produção de biossurfactante (estimada entre 400 a 500 toneladas/ano) é usada em processos relacionados a indústria petroquímica. As lamas e as frações de óleo pesado que se acumulam como depósitos sólidos no fundo dos tanques de armazenagem de óleo são altamente viscosas, não sendo possível a retirada pelo método convencional de bombeamento. Normalmente este tipo de limpeza requer lavagem com solvente ou limpeza manual, sendo ambos perigosos e caros. Uma alternativa para este processo de limpeza é a formação de uma emulsão óleo/água pelo uso de surfactante, promovendo a remoção da lama pelo processo de bombeamento e recuperação do resíduo após a quebra da emulsão. A aplicação de biossurfactantes neste processo foi iniciada na década de 70 e, nos anos 80 foram relatados os primeiros estudos em pequena escala do uso do emulsan (produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus*) na limpeza de vasos contaminados por óleo (BOGNOLO, 1999).

Uma possibilidade de mercado para os biossurfactantes seria na indústria de petróleo para biorremediação/dispersão, tanto no solo quanto no mar, durante os derramamentos de óleo; remoção/mobilização de óleos incrustados em tanques de estocagem, rochas e areia do mar, aumentando assim a sua recuperação (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Um segundo mercado para os biossurfactantes é na formação de emulsões que utilizam polímeros nas indústrias de pinturas, revestimento, asfalto, cimento, têxtil e de fibras, Além do emprego na remoção de metais pesados, no tratamento de

água, na mineração, em carvoarias e na proteção de madeira (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Em processos de remediação *in situ* não é necessário o uso de biossurfactante purificado, uma vez que os nutrientes do meio de cultura e as bactérias produtoras de surfactante auxiliam a promover a biodegradação. Por razões óbvias, se a fonte de carbono for um hidrocarboneto é recomendável que seja feita a remoção dos hidrocarbonetos do meio de cultura para que a solução possa ser utilizada na recuperação de solo e/ou lençol freático contaminado (ROY; KOMMALAPATI; MANDAVA, 1997).

Os poluentes orgânicos são um problema particular para processos de remediação do solo. Os componentes hidrofóbicos são difíceis de remover e sua disponibilidade para biodegradação é extremamente pequena. A aplicação de biossurfactantes para a remoção de poluentes hidrofóbicos tem como objetivo aumentar a biodisponibilidade e a biodegradabilidade destes compostos (LANG & PHILP, 1998).

A indústria farmacêutica e de cosméticos utilizam grandes quantidades de surfactantes numa variedade de produtos, tais como: repelentes de insetos, anti-ácidos, pomadas para acne, produtos anti-caspa, soluções para lentes de contato, tintura para cabelos, desodorantes, esmaltes para unhas, batom, sombra, máscaras, pasta de dentes, produtos de limpeza de dentaduras, anti-transpirantes, lubrificantes de preservativos, produtos para bebê, cremes para os pés, produtos de depilação e hidratantes (LINHARDT *et al.*, 1989).

Na indústria alimentícia, a emulsificação tem papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fases e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, na panificação e em produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras. Alguns produzidos por microrganismos estão sendo utilizados comercialmente, como por exemplo, o bioemulsificante produzido por *Candida utilis* que tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (NITSCHKE & PASTORE, 2002; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Outra aplicação de biossurfactantes é na indústria de laticínios, onde retardam a colonização de *Streptococcus thermophilus*, responsável pelo cheiro ou gosto ruim durante a pasteurização (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

De um modo geral, a função dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados. Outras aplicações envolvem a melhoria da textura e vida de prateleira de produtos contendo amido pela formação de complexos, modificação das propriedades reológicas da farinha de trigo pela interação com o glúten, melhor consistência e textura de produtos a base de gordura pelo controle do polimorfismo e da estrutura cristalina das gorduras, além de promover a solubilização de aromas (BARROS *et al.*, 2007).

Os biossurfactantes também possuem aplicações terapêuticas, por exemplo, os ramnolipídeos, lipopeptídeos e manosileritrolipídeos apresentam atividade antimicrobiana e são capazes de diminuir a adesão de bactérias patogênicas entéricas nas superfícies. Além disso, os ramnolipídeos possuem atividades pesticida, antibacteriana, antifúngica e antiviral e podem servir como fonte do ramnose (CHAYABUTRA; WU; JU, 2001, LANG & PHILP, 1998; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Os lipopeptídeos incluem a surfactina, viscosina e polimixina, as quais possuem efeitos antitumorais, antibióticos imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas.

Alguns biossurfactantes podem também estimular a adesão de bactérias em superfícies xenobióticas por influenciar a hidrofobicidade da superfície da célula bacteriana ou da superfície do xenobiótico (KUIPER *et al.*, 2004).

Na agricultura os biossurfactantes produzidos por *Bacillus* são utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados miscíveis (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Outra aplicação é no controle biológico de plantas patógenas como, por exemplo, a *Oplidium brassicae* e *Pythium aphanidermatum*, onde o biossurfactante ramnolipídeo demonstrou alta eficiência (MAIER & SOBERÓN-CHAVÉZ, 2000; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os biossurfactantes do tipo soforolipídeos (SLPs) apresentam atividade anticancerígena na inibição de tumores, ação desodorante e hidratante e biorremediação do solo. O microrganismo produtor pode usar vários substratos renováveis, *Candida bombicola*, por exemplo, utiliza carboidratos, óleos vegetais, gorduras animais, n-alcanos, ácido oléico e resíduos de refinaria de petróleo (PEKIN; VARDAR-SUKAN; KOSARIC, 2005).

A surfactina possui atividade bactericida, fungicida, antiviral, agente antitumoral, atua como inibidor da formação de coágulos fibrinosos,

antimicoplasmático, veículo para a administração de drogas via pulmonar e é capaz de inibir a formação de biofilmes de outras bactérias, incluindo a patógena *Salmonella*. A surfactina pode ser usada para fins medicinais em aplicações relacionadas ao aumento da segurança de produtos biotecnológicos e farmacêuticos, tais como derivados de sangue e produtos obtidos de culturas de células, os quais possuem risco de transmitir doenças, como o vírus da hepatite B, HIV ou herpes simples; devido a sua baixa toxicidade pode ser também aplicada em alimentos e cosméticos (BARROS *et al.*, 2007).

Outros surfactantes produzidos por culturas de *Pseudomonas* sp, *Alcaligenes* sp, *Acinetobacter calcoaceticus* A2 e *Candida bombicola* foram utilizados na mineração para flotação, prevenção de flocculação e solubilização de carvão (NITSCHKE & PASTORE, 2002; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento e caracterização das bactérias produtoras

Amostras não contaminadas e contaminadas com hidrocarbonetos foram coletadas em diferentes locais (solo de borracharia, solo de posto de gasolina, areia do mar contaminada com petróleo, areia do mar sem contaminação e terra fértil), escolhidos aleatoriamente. Para o isolamento de bactérias possíveis produtoras,

foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina (0,85%) até 10^{-15} e plaqueadas em ágar padrão para contagem (PCA), seguido de incubação a 30°C por 24 e 48 horas. As bactérias obtidas foram replaqueadas em ágar-sangue por 24 e 48 horas a 30°C. A presença de halo de β -hemólise sugeriu a produção de biossurfactantes.

4.2. Manutenção das bactérias produtoras

As bactérias possíveis produtoras, ou seja, β -hemolíticas, foram semeadas em tubos inclinados de PCA durante 24 horas a 30°C e depois foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

4.3. Identificação das bactérias

Os gêneros bacterianos foram identificados através das características morfológicas microscópicas e macroscópicas, além de serem submetidos a testes bioquímicos de atividade enzimática (amilase, protease, lecitinase, gelatinase, catalase, oxidase, urease), fermentação de açúcares (lactose, sacarose, frutose, maltose, manitol, glicose), fenilalanina, citrato, ágar lisina ferro (LIA), ágar três açúcar e ferro (TSIA), vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), indol, motilidade, nitrato de acordo com Bergey's (1984). A espécie foi identificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio do gene RNA ribossomal 16S.

4.4. Produção dos biossurfactantes

4.4.1. Microrganismos

Para a produção dos biossurfactantes microbianos foram utilizadas as bactérias previamente selecionadas e identificadas no item 4.3.

4.4.2. Meio base

O meio base empregado para a fermentação foi o proposto por Bicca; Fleck; Ayub (1999) acrescentado da fonte de carbono selecionada. O meio constou de (g/L):

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
KCl	0,1
KH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂	0,01
K ₂ HPO ₄	1,0
NaNO ₃	7,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Extrato de levedura	0,1
Óleo diesel	1,0% (v/v)

4.4.3. Meio de produção

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio base proposto por Bicca; Fleck; Ayub (1999), previamente esterilizado e foram testados diferentes valores de pH (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), tempo de fermentação (48, 72 e 96 horas) e diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, manitol, caldo de cana, glicose mais frutose e frutose) nas concentrações de 1 a 5%. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.4. Produção do biossurfactante

Cada bactéria foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo nutriente e incubada por 24 h. a 30°C. Após a incubação, foi feita a suspensão de células de cada tubo e submetida à leitura de densidade óptica a 620 nm até 0,05 para padronização do inóculo sendo então transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL de meio de produção seguido de incubação a 30°C e 200 rpm. O caldo de fermentação foi centrifugado a 13608 g a 4°C por 20 min. para separação das células.

4.5. Determinação da presença de biossurfactantes

Os caldos fermentados livres de células foram submetidos à análise de tensão superficial, índice de emulsificação, concentração micelar crítica (CMC), atividade emulsificante, atividade antimicrobiana e degradação do petróleo.

4.5.1. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi determinada em 10 mL do sobrenadante colocados em uma placa de Petri (9,5 cm de diâmetro) e medida diretamente da superfície do emulsificante com um tensiômetro de Leconde Du Nouy. Esta placa foi utilizada na determinação de todas as leituras de todas as amostras (BICCA; FLECK; AYUB, 1999).

4.5.2. Índice de emulsificação (E_{24})

Foi determinado em tubos de ensaio com tampa de rosca pela adição de 2,0 mL de tolueno a 3,5 mL do sobrenadante, misturando em agitador de tubo por 2 min. e deixado em repouso por 24 horas. O índice foi calculado como porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido (cm) (BICCA; FLECK; AYUB, 1999).

4.5.3. Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante foi determinada em tubos de ensaio com tampa de rosca misturando em agitador de tubo durante 2 min., 3,5 mL da solução do biossurfactante com 2 mL de tolueno e realizando-se a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro a 610 nm (KIM *et al.*, 2000).

4.5.4. Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A determinação da CMC foi realizada pela medida da tensão superficial do sobrenadante (livre de células) diluindo-se sucessivamente (volumes iguais de água)

até o valor da tensão próximo ao valor da água. O valor da CMC foi dada pelo ponto central da inflexão da curva do gráfico tensão superficial versus concentração de sobrenadante contendo o biossurfactante (KIM *et al.*, 2000).

4.5.5. Separação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes foram separados do sobrenadante por precipitação com etanol absoluto (1:2) à 4°C por 24 h. e secos em estufa a vácuo a 45°C até peso constante.

4.5.6. Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi determinado pelo peso seco das células obtidas durante a produção, as quais foram transferidas quantitativamente com água destilada, para placas de Petri pré-pesadas e secas em estufa a vácuo a 45°C até peso constante.

4.5.7. Purificação do biossurfactante

O biossurfactante precipitado do sobrenadante livre de células com etanol (1:2) foi purificado por diálise usando uma membrana de diâmetro 2,5 cm e poro 10 kDa em água destilada. A diálise foi realizada durante 72 horas e a água da diálise trocada três vezes ao dia.

4.5.8. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando dois métodos: em placas de Petri e em tubos de ensaio.

Para os testes em placas, as bactérias selecionadas e seus sobrenadantes foram introduzidos ao meio através da impregnação em discos estéreis, os quais foram colocados nas placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA) que foram previamente inoculadas por superfície com bactérias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus circulans* e *Bacillus polymyxa*) e as Gram negativas (*Escherichia coli*, *Citrobacter diversus* e *Klebsiella pneumoniae*). Também foram colocados discos impregnados com as bactérias selecionadas e seus sobrenadantes em placas

contendo ágar dextrose batata (PDA) previamente inoculados com *Aspergillus awamori* para testar sua atividade antifúngica. As leituras dos halos de inibição foram realizadas por 24, 48 e 72 horas para as bactérias e 5 dias para o fungo os quais são um indicativo de atividade antimicrobiana. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Para os testes em tubos de ensaio 0,1 mL de cada sobrenadante produzido nos caldos de fermentação foram adicionados em tubos contendo caldo nutriente que foram previamente inoculados com as bactérias Gram positivas e Gram negativas e o fungo teste. O controle do crescimento destes microrganismos foi acompanhado em tubos sem a presença de biossurfactante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 620 nm por 24, 48 e 72 horas para as bactérias e 5 dias para o fungo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.9. Fluidez do petróleo

Placas de Petri contendo areia (10 g), inóculo das bactérias selecionadas (2%) e petróleo (1%) foram incubadas a 30°C por 20 dias. O controle negativo não possuía inóculo, após este período as placas foram submetidas a análise macroscópica para observação da fluidez do petróleo (GOUVEIA *et al.* 2003).

4.6. Determinação da composição do biossurfactante

Para a determinação de sua composição o biossurfactante purificado foi analisado por ressonância magnética nuclear (RMN) e foi realizada a análise da presença de proteína pelo método de Kjeldahl, conforme Joslyn (1970), presença de gordura por Bligh-Dyer (1959), açúcares redutores e açúcares totais por Somogy-Nelson (1952; 1944) e Dubois; Gilles; Hamilton (1956).

4.7. Determinação do efeito do biossurfactante num sistema modelo sal-vinagre-azeite

Foram realizados ensaios utilizando o biossurfactante purificado num sistema modelo que imita um molho para salada. As leituras do índice de emulsificação (E_{24}) foram realizadas em misturas de várias proporções de vinagre, azeite e sal com a concentração do biossurfactante constante (3,5 mL); estas foram homogeneizadas em agitador de tubos por 2 min. e após deixadas em repouso por 24 horas. O índice de emulsificação foi calculado como a porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido (cm). As proporções foram determinadas usando o programa Statistica 7 planejamento fatorial completo 3** (3-0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento das bactérias produtoras de biossurfactantes

Neste trabalho foram colhidas cinco amostras de diferentes origens: solo de borracharia (amostra 1), de posto de gasolina (2), areia de praia não-contaminada por hidrocarbonetos (3), areia de praia contaminada por hidrocarbonetos (4) e solo fértil (5) para testes de produção de biossurfactantes.

Da amostra 1 foram selecionadas sete colônias, da 2 oito, da 3 uma, da 4 seis e 5 seis, totalizando vinte e oito colônias. Nestas foi realizada a coloração de Gram para identificação de suas características morfológicas e verificar sua pureza.

Na Tabela 5 pode-se observar que das vinte e oito colônias bacterianas coradas, vinte e cinco são bastonetes Gram positivos, um cocobacilo Gram negativo e dois cocos Gram positivos.

Tabela 5. Coloração de Gram das bactérias isoladas das cinco amostras de solo e areia de praia.

Amostra 1 (borracharia)	Gram
1A	Bastonetes (+)
1B	Bastonetes (+)
1C	Bastonetes (+)
1D	Bastonetes (+)
1E	Bastonetes (+)
1F	Bastonetes (+)
1G	Bastonetes (+)
Amostra 2 (posto de gasolina)	Gram
2A	Bastonetes (+)
2B	Bastonetes (+)

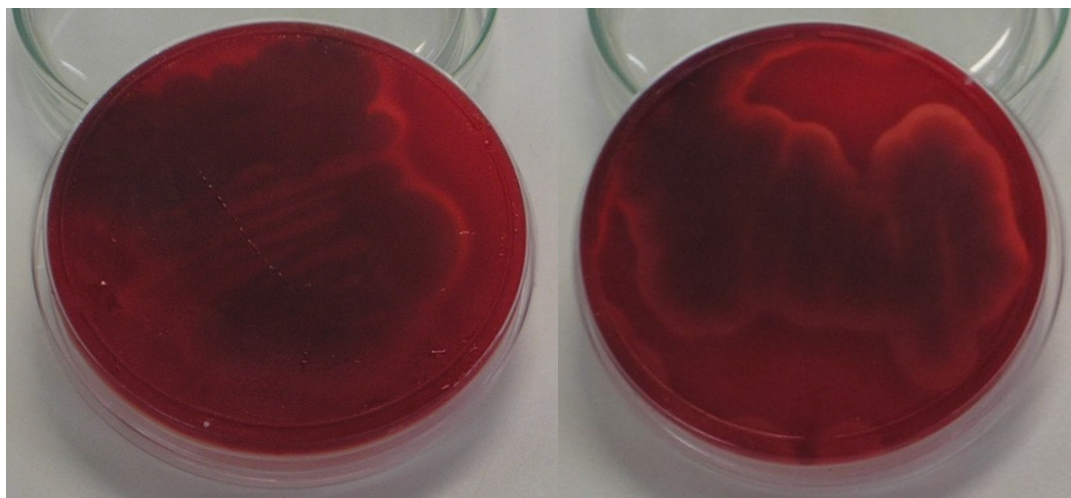
2C	Bastonetes (+)
2D	Bastonetes (+)
2E	Bastonetes (+)
2F	Bastonetes (+)
2G	Bastonetes (+)
2H	Cocos (+)
<hr/>	
Amostra 3 (praia não-contaminada)	Gram
<hr/>	
3A	Cocos (+)
<hr/>	
Amostra 4 (praia contaminada)	Gram
<hr/>	
4A	Bastonetes (+)
4B	Bastonetes (+)
4C	Bastonetes (+)
4D	Bastonetes (+)
4E	Bastonetes (+)
4F	Coco bacilos (-)
<hr/>	
Amostra 5 (solo não-contaminado)	Gram
<hr/>	
5A	Bastonetes (+)
5B	Bastonetes (+)
5C	Bastonetes (+)
5D	Bastonetes (+)
5E	Bastonetes (+)
5F	Bastonetes (+)
<hr/>	

Segundo Bicca; Fleck; Ayub (1999) e Lin (1996), bactérias possíveis produtoras de biossurfactantes apresentam atividade hemolítica, sendo esta uma determinação rápida para reduzir o número de bactérias selecionadas para os testes de produção de biossurfactante.

Atividade hemolítica é um fator exibido por microrganismos capazes de se desenvolver usando proteínas ligadas a ferro como fonte de ferro. A hemoglobina é uma importante fonte de ferro para estes microrganismos que realizam a hemólise por meio de proteínas extracelulares que destroem as membranas dos eritrócitos humanos. Portanto, as vinte e oito colônias foram submetidas ao teste em placas de Petri contendo ágar-sangue (Fotografia 1, Tabela 6).

Na Fotografia 1 pode ser observada a presença do halo de β -hemólise formado pelas bactérias produtoras e a Tabela 6 mostra os resultados do teste de hemólise em placas de Petri para as 28 colônias. Na Tabela 6 pode-se observar que

das vinte e oito colônias bacterianas testadas apenas treze apresentaram hemólise em placas de ágar-sangue sendo estas selecionadas para as etapas seguintes.



Fotografia 1. Placas de ágar-sangue com halo de β -hemólise positiva.

Tabela 6. Teste de hemólise em placas de Petri contendo ágar-sangue para as colônias isoladas de solo e areia de praia.

Amostra 1 (borracharia)	hemólise
1A	(+)
1B	(+)
1C	(+)
1D	(+)
1E	(-)
1F	(+)
1G	(+)
Amostra 2 (posto de gasolina)	hemólise
2A	(-)
2B	(-)
2C	(+)
2D	(-)
2E	(-)
2F	(-)

2G	(-)
2H	(-)
Amostra 3 (praia não-contaminada)	hemólise
3A	(-)
Amostra 4 (praia contaminada)	hemólise
4A	(+)
4B	(+)
4C	(-)
4D	(+)
4E	(-)
4F	(+)
Amostra 5 (solo não-contaminado)	hemólise
5A	(+)
5B	(+)
5C	(-)
5D	(-)
5E	(-)
5F	(-)

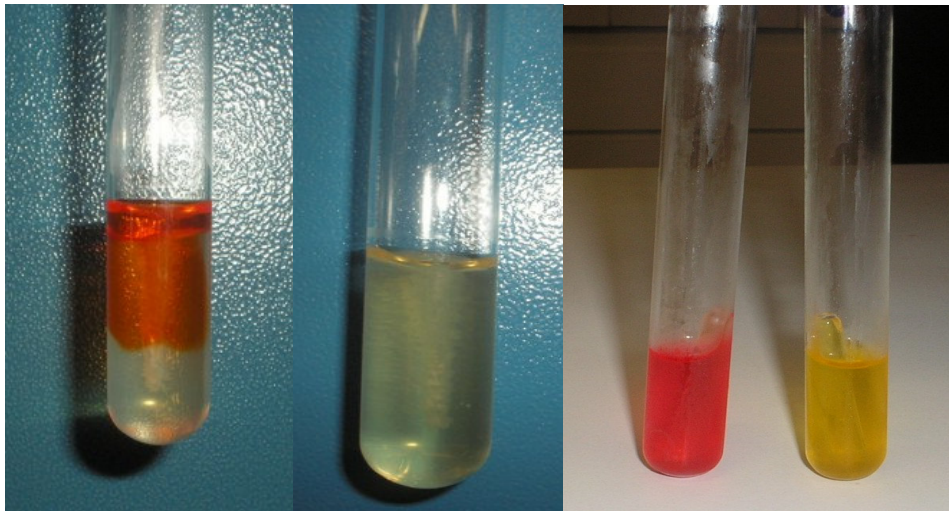
Segundo vários pesquisadores (MESQUITA, 2004; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000, NITSCHKE & PASTORE, 2002) as bactérias com atividade biossurfactante reduzem a tensão superficial do caldo de fermentação e produzem emulsões estáveis após 24 horas (E_{24}), pelo fato de que produzem substâncias anfifílicas. Em nosso experimento foram realizados testes de tensão superficial e índice de emulsificação no caldo de fermentação sem a presença de células das treze bactérias β -hemolíticas, as quais foram previamente inoculadas em meio sintético proposto por Bicca; Fleck; Ayub (1999) e incubadas por 72 horas a 30°C a 200 rpm, posteriormente centrifugadas a 13608 g a 4°C para a separação das células. Os resultados mostraram que o meio sem inóculo apresentou uma tensão superficial de 66,1 Din/cm. As bactérias que provocaram uma redução de no mínimo 20% da tensão superficial do meio básico e apresentaram índice de emulsificação estável após 24 horas, foram selecionadas para a etapa de identificação por testes bioquímicos. As selecionadas foram : 1B, 1C, 1D, 1F, 1G, 2C, 4D e 5A.

5.2. Identificação das bactérias

Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	-	-	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	+	+	+	+	+

B: am (base amarela); S: ver. (superfície vermelha)

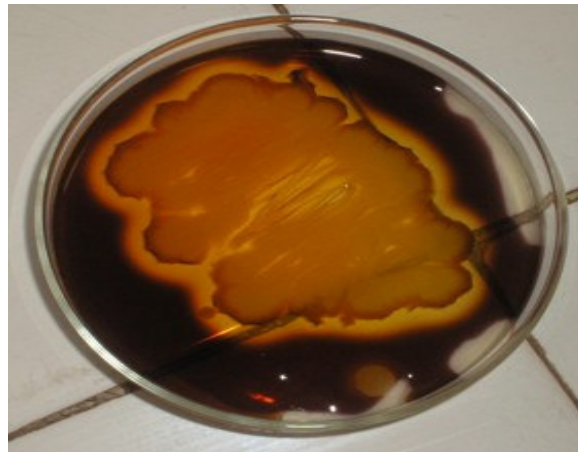
- Não houve presença de gás em nenhum dos tubos dos testes de fermentação de açúcares



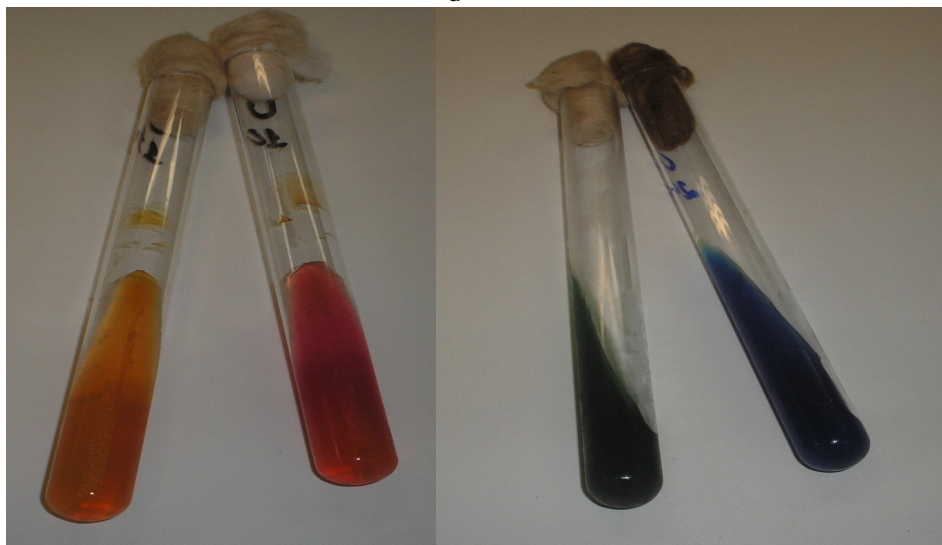
a

b

c



d



e

f

Fotografia 2. Testes bioquímicos: a) nitrato, b) motilidade, c) fermentação de açúcares, d) amilase, e) urease e f) citrato.

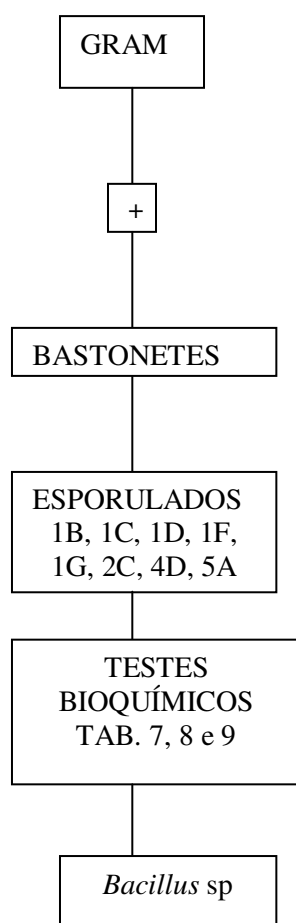
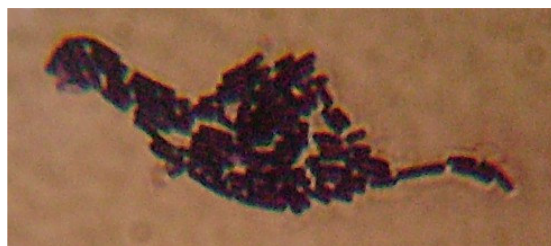


Figura 6. Representação das principais etapas utilizadas durante a identificação do gênero das bactérias selecionadas.

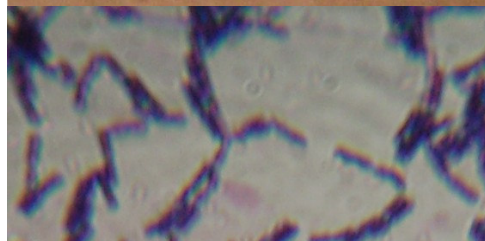
A análise dos resultados dos testes bioquímicos da Tabela 7 e Figura 6 demonstraram a presença dos gêneros *Bacillus* sp. Este mesmo gênero foi identificado por Rahman *et al.* (2002b e 2003b) em solos contaminados por hidrocarbonetos, além de também observarem a presença de *Pseudomonas* sp, *Flavobacterium* sp, *Micrococcus* sp, *Acinetobacter* sp e *Corynebacterium* sp.

O gênero *Bacillus* é caracterizado por células em forma de bastonetes retos, Gram positivos, a maior parte é móvel e forma endosporos. São quimiorganotróficos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, Voges-Proskauer (VP), reações de nitrato, oxidase, urease, citrato e gelatinase positiva ou negativa, indol negativo e catalase positiva. Fermentam vários carboidratos como a glicose e a sacarose sem produção de gás e são comumente encontrados no solo, água e ar (BERGEY'S, 1984).

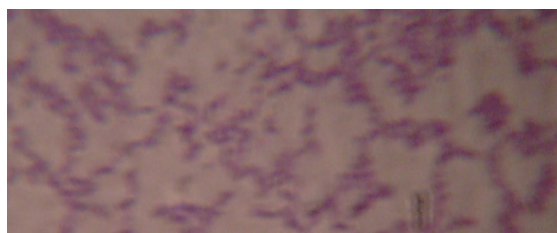
Das oito bactérias selecionadas, quatro foram escolhidas para a determinação dos parâmetros de produção do biossurfactante e suas características morfológicas e tintoriais à coloração de Gram podem ser observadas na Fotografia 3 assim como suas fontes de coleta estão descritas na Tabela 8.



a



b



c



d

Fotografia 3. Representação microscópica das bactérias Gram +: a) 4D; b) 1G; c) 2C e d) 5A.

Tabela 8. Fontes de coleta das quatro bactérias selecionadas relacionadas aos respectivos gêneros.

Amostras	Designação	Gênero
solo de borracharia	1G	<i>Bacillus</i> sp
solo de posto de gasolina	2C	<i>Bacillus</i> sp
areia da praia contaminada	4D	<i>Bacillus</i> sp
solo fértil	5A	<i>Bacillus</i> sp

5.3. Determinação dos parâmetros de produção

Para a produção de biossurfactante foi utilizado o meio M2 proposto por Bicca; Fleck; Ayub (1999), pois testes preliminares realizados por estes autores utilizando três meios de composição diferentes (M1, M2 e M3) mostraram que as células bacterianas apresentaram um ótimo crescimento com alta produtividade de biossurfactante, o qual está relacionado a redução da tensão superficial e altos E_{24} , utilizando o meio que possuía como um dos seus componentes principais o extrato de levedura (M2).

O meio de produção composto de minerais, nitrogênio e óleo diesel foi acrescido de uma fonte de carbono, inoculado com os *Bacillus* sp (1G, 2C, 4D e 5A) e incubado a 30°C e 200 rpm em “shaker” rotativo (Fotografia 4), com posterior centrifugação a 13608 g a 4°C por 20 minutos para a separação da célula. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



Fotografia 4. Caldo de fermentação durante incubação a 30°C e 200 rpm em “shaker” rotativo.

Foram testados diferentes pH (5, 6, 7 e 8) e diferentes tempos de fermentação (48, 72 e 96 horas) para escolha do melhor parâmetro de produção, para em seguida serem testadas diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, manitol, caldo de cana, frutose e glicose + frutose (p/p) em diferentes concentrações (1, 2, 3, 4 e 5%). Como controle da produção de biossurfactante foi utilizada a bactéria *Bacillus subtilis* que segundo Barros *et al.* (2007) é uma clássica produtora de biossurfactante.

Os testes realizados para determinar o melhor pH e tempo de fermentação foram a determinação da tensão superficial, índice de emulsificação, além da determinação do peso celular seco.

Para a determinação da tensão superficial foi utilizado o caldo de fermentação sem a presença das células e as leituras foram realizadas em um tensiômetro de Leconde Du Nouy (Fotografia 5). Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

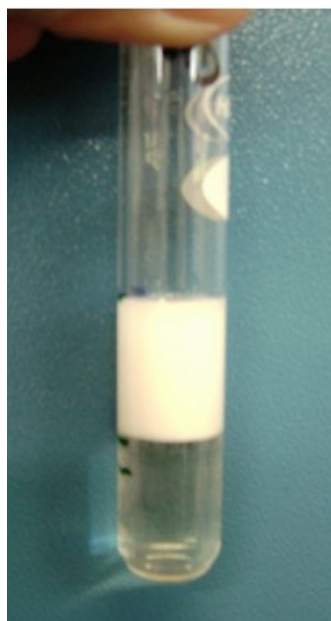


a

b

Fotografia 5. Tensiômetro de Leconde Du Nouy.

Para a determinação do índice de emulsificação foi utilizado tolueno e o caldo de fermentação pré-centrifugado (para a separação das células) na proporção 2:3,5 mL, a altura total da coluna foi de 4,5 cm. As leituras foram realizadas após 24 horas e estas permaneceram constantes por 30 dias sem que ocorresse alteração na porcentagem do índice como mostrado na Fotografia 6. Os resultados encontram-se na Tabela 9.



Fotografia 6. Determinação do índice de emulsificação por meio da formação de uma coluna de tolueno.

O peso celular seco dos *Bacillus* sp 1G, 2C, 4D e 5A a diferentes pH e tempo de fermentação está apresentado na Tabela 9.

Tabela 9: Leituras de tensão superficial (Din/cm), índice de emulsificação (%) e peso celular seco (g) dos *Bacillus* sp em diferentes pH e tempo de fermentação.

Tensão superficial											
Amostras	pH = 5,0			pH = 6,0			pH = 7,0			pH = 8,0	
	48 h.	72h.	96h.	48h.	72h.	96h.	48h.	72h.	96h.	48h.	72h.
1G	59,9	58,5	59,0	61,7	50,8	51,2	56,5	55,8	56,2	59,5	58,0
2C	57,8	56,0	56,0	60,5	57,8	58,0	57,0	54,0	55,0	60,0	57,5
4D	58,8	57,0	57,3	61,0	60,0	60,2	56,5	53,5	54,5	60,5	58,0
5A	57,2	55,8	56,0	62,0	59,8	60,0	56,1	54,0	55,3	59,0	56,4
<i>B. subtilis</i>	56,1	53,7	53,8	59,5	55,7	56,3	55,2	54,0	56,0	60,0	58,0
Índice de emulsificação											
Amostras	pH = 5,0			pH = 6,0			pH = 7,0			pH = 8,0	
	48 h.	72h.	96h.	48h.	72h.	96h.	48h.	72h.	96h.	48h.	72h.
1G	28,8	44,4	33,3	0,0	0,0	0,0	11,1	33,3	22,2	4,4	15,5
2C	37,7	48,8	40,0	33,3	37,7	33,3	35,5	44,4	40,0	35,5	37,7
4D	22,2	44,4	33,3	0,0	17,7	0,0	33,3	28,8	33,3	3,3	17,7
5A	22,2	40,0	30,0	0,0	0,0	0,0	33,3	35,5	33,3	28,8	33,3
<i>B. subtilis</i>	11,1	15,5	12,2	0,0	8,8	0,0	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1
Peso celular seco											
Amostras	pH = 5,0			pH = 6,0			pH = 7,0			pH = 8,0	
	48 h.	72h.	96h.	48h.	72h.	96h.	48h.	72h.	96h.	48h.	72h.
1G	0,119	0,153	0,150	0,029	0,087	0,088	0,140	0,147	0,144	0,023	0,072
2C	0,106	0,177	0,176	0,068	0,120	0,121	0,161	0,170	0,169	0,030	0,070

4D	0,044	0,142	0,140	0,038	0,065	0,065	0,073	0,130	0,131	0,070	0,090
5A	0,070	0,148	0,145	0,065	0,120	0,121	0,110	0,127	0,127	0,035	0,037
<i>B. subtilis</i>	0,114	0,116	0,116	0,086	0,113	0,112	0,120	0,137	0,136	0,070	0,072

- Tensão superficial do meio base: 66,1 Din/cm, Din/cm=mN/m,

- Leituras do índice de emulsificação realizadas após 24 horas, 96 horas, 7 dias, 15 dias e 30 dias

De acordo com a Tabela 9 podemos observar que os melhores pH foram 5,0 e 7,0 e o tempo de fermentação de 72 horas (fase estacionária) onde ocorreram as maiores porcentagens do índice de emulsificação e também a melhor redução da tensão superficial. Com relação ao crescimento celular podemos observar que este é diretamente proporcional a produção de biossurfactante que, por sua vez, está relacionada a diminuição da tensão superficial e índice de emulsificação. Rajeshware; Prakash; Ghosh (1995) identificou que a produção de biopolímeros ocorre na fase estacionária e Bueno (2001) observou que a curva de crescimento de bactérias do gênero *Bacillus* mostrou que o desenvolvimento máximo ocorre em 12 horas e permanece constante até 72 horas (fase estacionária) com posterior declínio.

Segundo Fleurackers (2006), a produção do biossurfactante soforolipídeo produzido pelo gênero *Candida* ocorre na fase estacionária após a redução do nitrogênio disponível e quando as fontes apropriadas de carbono e de energia estiverem presentes e quando possível, estas fontes são incorporadas diretamente no soforolipídeo.

Estas mesmas observações dos autores citados foram comprovadas em relação aos *Bacillus* sp testadas (1G, 2C, 4D e 5A) onde a melhor produção do biopolímero ocorreu após 72 horas de fermentação.

Para o estudo das diferentes fontes de carbono em diferentes concentrações escolheu-se o pH = 7,0 devido a este ser neutro e tempo de fermentação de 72 horas.

A glicose foi usada como fonte de carbono por vários pesquisadores (HUA *et al.*, 2004; VANCE-HARROP; GUSMÃO; CAMPOS-TAKAKI, 2003; BICCA; FLECK; AYUB, 1999; SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006; FLEURACKERS, 2006, RAHMAN *et al.* 2003a). Neste trabalho foram estudadas outras fontes de carbono inclusive a sacarose e o caldo de cana, por serem matérias-primas abundantes e de baixo custo no mercado nacional.

As fontes de carbono testadas foram glicose, sacarose, manitol, frutose, caldo de cana e glicose + frutose (p/p) nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0%. As análises realizadas para determinação da melhor fonte de carbono e concentração

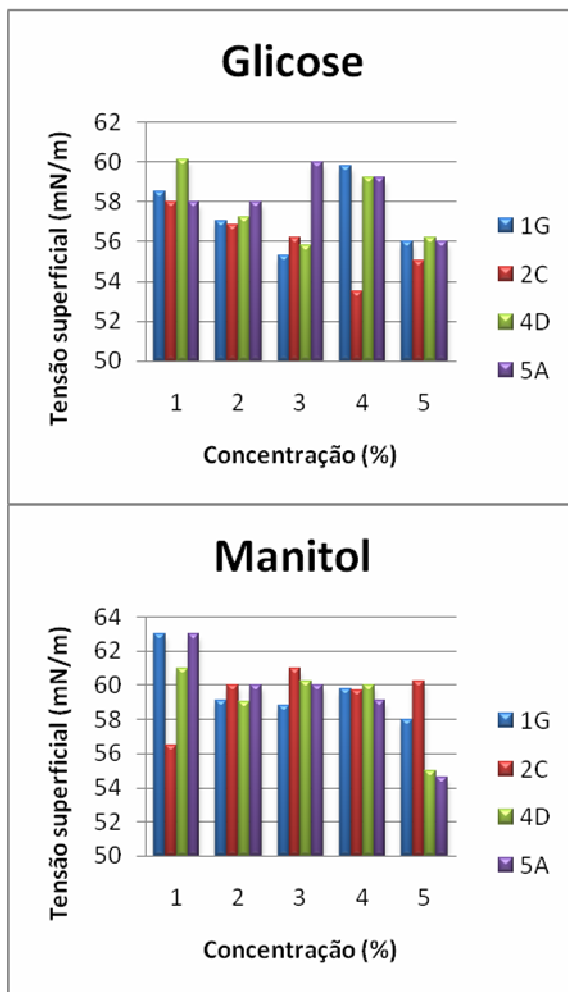
consistiram de determinação da tensão superficial, índice de emulsificação, atividade emulsificante (para estas análises foi utilizado o caldo de fermentação sem a presença de células) e peso celular seco. O caldo de cana foi clarificado e esterilizado em vapor fluente antes de seu uso.

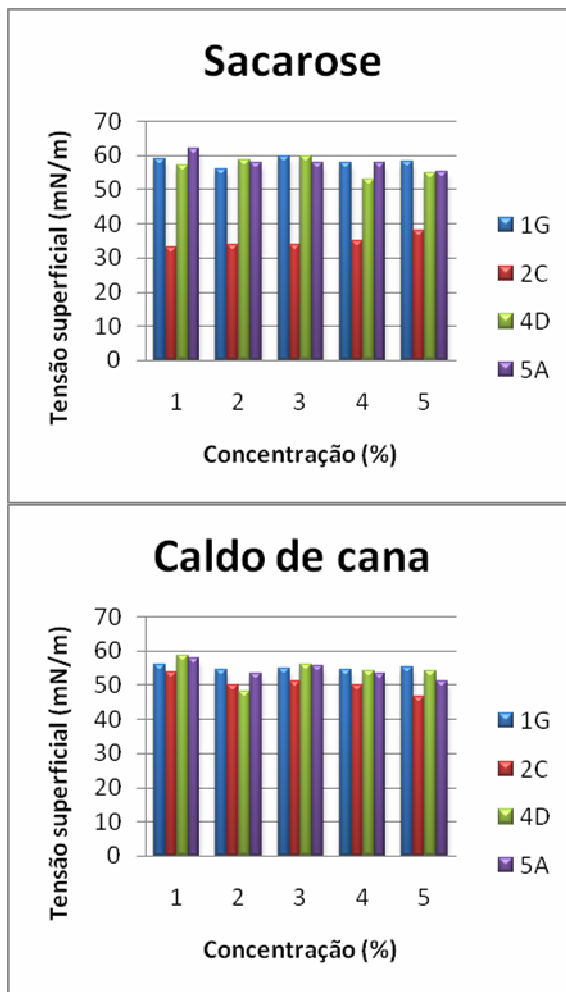
Foram utilizadas estas análises, pois a melhor concentração e fonte de carbono proporciona a melhor produção de biossurfactante e por sua vez, sua presença e quantificação está relacionada a baixas leituras de tensão superficial, índices de emulsificação altos e estáveis e alta atividade emulsificante.

A Figura 7 apresenta os resultados das medidas de tensão superficial em relação às das fontes de carbono em diferentes concentrações. O meio base apresentou uma tensão superficial de 66,1 Din/cm (Din/cm=mN/m).

Na Figura 8 está apresentada a variação do índice de emulsificação em coluna de tolueno, em relação às fontes de carbono em diferentes concentrações. As leituras foram realizadas após 24 horas e estas permaneceram constantes por 30 dias sem que ocorresse alterações.

O peso celular seco dos *Bacillus* sp 1G, 2C, 4D e 5A nas fontes de carbono em diferentes concentrações (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0%) estão apresentados na Tabela 10. Nesta pode-se observar novamente que o crescimento é diretamente proporcional a produção de biossurfactante que está diretamente relacionado com a diminuição da tensão superficial e o aumento do índice de emulsificação.





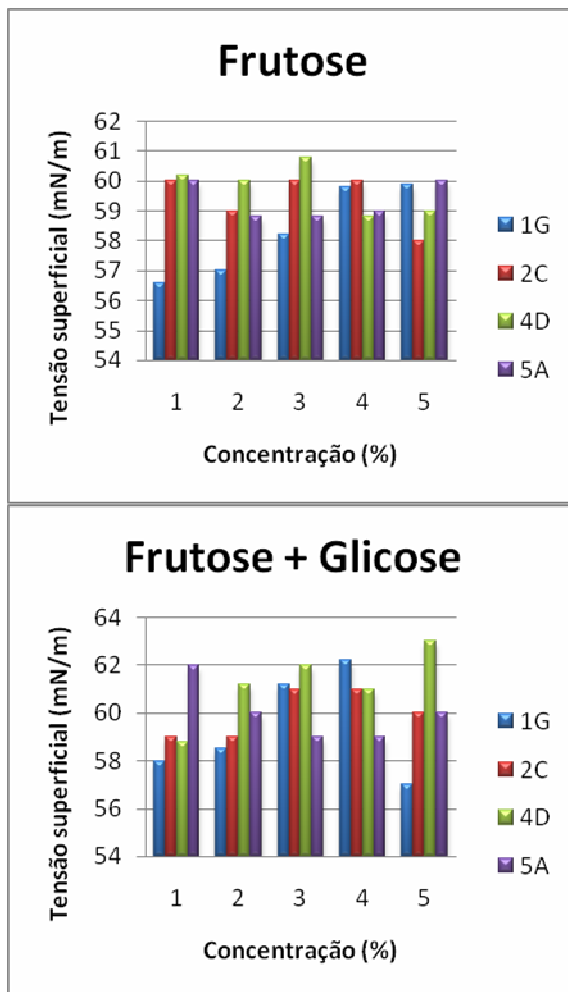
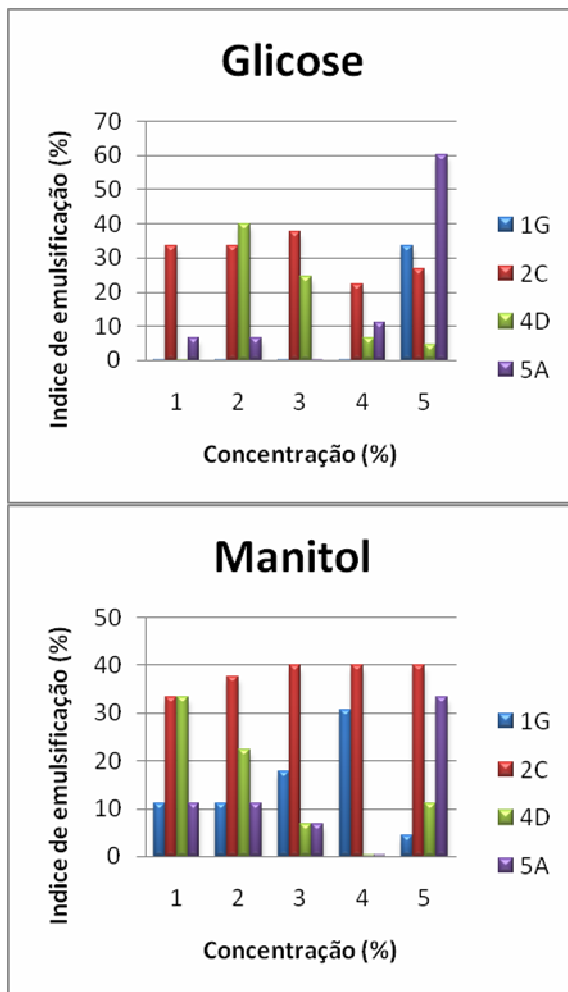
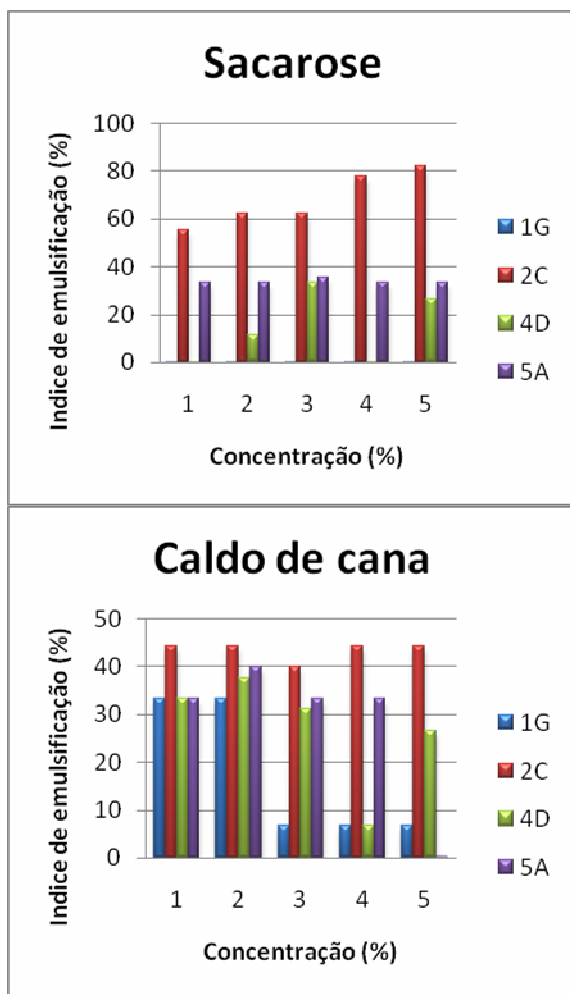


Figura 7. Determinação da tensão superficial no sobrenadante livre de células em diferentes fontes de carbono e concentrações a 30⁰C e 72 horas de incubação dos *Bacillus* sp selecionados.





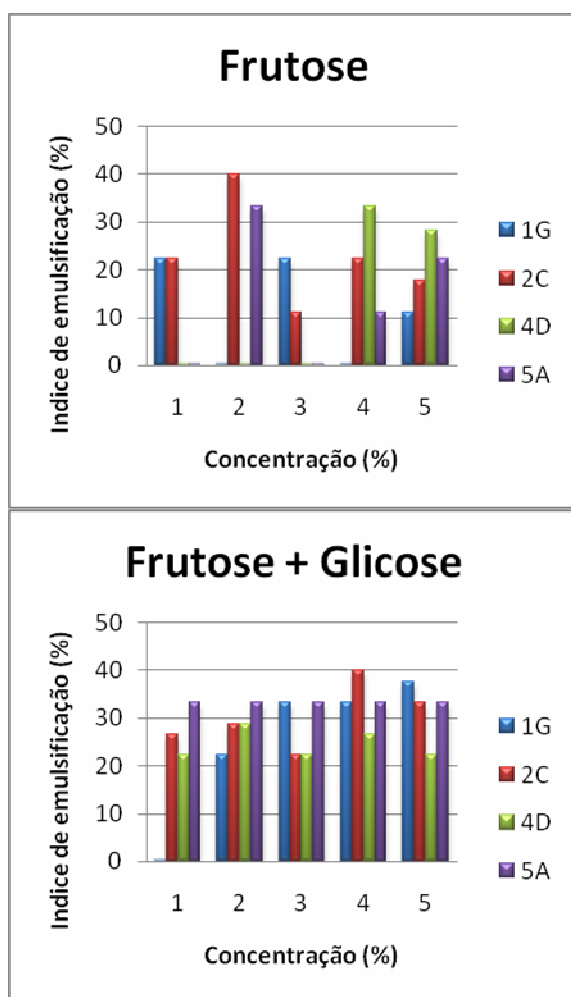


Figura 8. Porcentagem do índice de emulsificação dos *Bacillus* sp selecionados em relação às diferentes fontes de carbono e concentrações a 30⁰C e 72 horas de incubação.

Tabela 10. Determinação do peso celular seco (g) dos *Bacillus* sp em 50 mL do caldo de fermentação selecionadas em diferentes fontes de carbono e concentrações.

		Glicose			
Concentração (%)		1G	2C	4D	5A
1		0,0402	0,0522	0,0473	0,0426
2		0,0426	0,0572	0,0514	0,0590
3		0,0590	0,0672	0,0400	0,0405
4		0,0393	0,0789	0,0221	0,0393
5		0,0460	0,0352	0,0480	0,0357
		Sacarose			
Concentração (%)		1G	2C	4D	5A
1		0,0435	0,1250	0,0256	0,0240
2		0,0498	0,1508	0,0492	0,0626
3		0,0310	0,1057	0,0291	0,0608
4		0,0360	0,1203	0,0300	0,0480

5	0,0300	0,1699	0,0312	0,0504
Manitol				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,0452	0,0811	0,0275	0,0327
2	0,0598	0,0874	0,0437	0,0398
3	0,0540	0,0636	0,0356	0,0346
4	0,0430	0,0800	0,0350	0,0330
5	0,0450	0,0820	0,0432	0,0271
Caldo de cana				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,0852	0,1203	0,0360	0,0358
2	0,0939	0,1503	0,1560	0,0506
3	0,0845	0,8990	0,0425	0,0352
4	0,0662	0,1079	0,0507	0,0400
5	0,0630	0,1499	0,0499	0,0507
Frutose				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,0423	0,0876	0,0234	0,0324
2	0,0521	0,0920	0,0435	0,0435
3	0,0490	0,0891	0,0324	0,0324
4	0,0400	0,0903	0,0333	0,0400
5	0,0450	0,0945	0,0323	0,0398
Frutose + Glicose				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,0242	0,1123	0,0345	0,0432
2	0,0324	0,1203	0,0432	0,0546
3	0,0321	0,1201	0,0325	0,0436
4	0,0402	0,1190	0,0456	0,0567
5	0,0440	0,1123	0,0563	0,0546

Tabela 11. Determinação da atividade emulsificante no sobrenadante livre de células a 610 nm dos *Bacillus* sp selecionados.

Glicose				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,024	0,370	0,200	0,150
2	0,520	0,404	0,430	0,300
3	0,100	0,430	0,100	0,160
4	0,200	0,630	0,200	0,300
5	0,030	0,555	0,150	0,050
Sacarose				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,435	0,490*	0,280	0,256
2	0,540	0,630*	0,420	0,430
3	0,450	0,600*	0,253	0,350
4	0,430	0,700*	0,340	0,300
5	0,430	0,720*	0,298	0,312
Manitol				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,290	0,280**	0,210	0,080
2	0,440	0,655**	0,330	0,120

3	0,330	0,489**	0,100	0,030
4	0,340	0,700**	0,080	0,033
5	0,125	0,720**	0,090	0,027
Caldo de cana				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,300**	0,210*	0,620	0,550***
2	0,420**	0,428*	0,580 ***	0,824***
3	0,380**	0,409*	0,200	0,580***
4	0,500**	0,500*	0,550	0,489***
5	0,630**	0,540*	0,650	0,520***
Frutose				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,320	0,290	0,650	0,450
2	0,450	0,498	0,570	0,724
3	0,388	0,489	0,280	0,480
4	0,560	0,550	0,520	0,489
5	0,670	0,590	0,658	0,620
Frutose + Glicose				
Concentração (%)	1G	2C	4D	5A
1	0,200***	0,310**	0,520	0,450***
2	0,440***	0,488**	0,380 **	0,802***
3	0,240***	0,400**	0,280	0,680***
4	0,580***	0,560**	0,500	0,589***
5	0,600***	0,540**	0,750	0,570***

* diluição 1:10, ** diluição 1:7, *** diluição 1:1

Para a determinação da atividade emulsificante foi utilizado o caldo de fermentação sem a presença de células (sobrenadante), onde foi adicionado tolueno na proporção 2:3,5, esta mistura foi agitada para a formação da emulsão e as leituras das densidades ópticas foram feitas em espectrofotômetro a 610 nm (o branco foi preparado da mesma maneira com substituição do sobrenadante por água). Na Tabela 11 estão apresentadas as leituras da atividade emulsificante no sobrenadante obtido das bactérias selecionadas. Nesta, pode ser observado que quanto maior a densidade óptica maior é a atividade emulsificante. Segundo Lang (2002) o emulsan atinge uma densidade óptica de 2,44 a 600 nm. Em nossos experimentos, resultados superiores foram obtidos utilizando as fontes de carbono sacarose e caldo de cana e principalmente a bactéria 2C (*Bacillus* sp) foi a melhor produtora do biossurfactante (Tabela 11).

Dos resultados mostrados nas Figuras 8 e 9 e Tabelas 10 e 11 podemos observar que a melhor fonte de carbono foi a sacarose. Concentrações baixas desta fonte de carbono são suficientes para estimular alta produtividade de biossurfactante

e esta alta produtividade pode ser alcançada utilizando matérias-primas baratas e regionais. Pode também ser observado que apesar do caldo de cana ter altos teores de sacarose, a presença de outros componentes no caldo interferiu e não estimulou uma produtividade tão alta quanto a sacarose pura. A mistura de frutose + glicose não estimulou também uma boa produtividade, talvez pelo fato da presença de frutose inibir a produção, pois quando esta foi utilizada sozinha houve baixa produtividade do biossurfactante.

A melhor produtividade foi alcançada utilizando a bactéria 2C (*Bacillus* sp) e esta foi selecionada para a determinação da concentração micelar crítica (CMC) em meio contendo sacarose e caldo de cana nas concentrações de 2%, pH=7,0 e 72 horas de fermentação, foram utilizados estes sobrenadantes pois apresentaram os melhores parâmetros de produção de biossurfactante. Na Figura 9 estão apresentadas as curvas de tensão superficial versus concentração de sobrenadante para o cálculo do CMC.

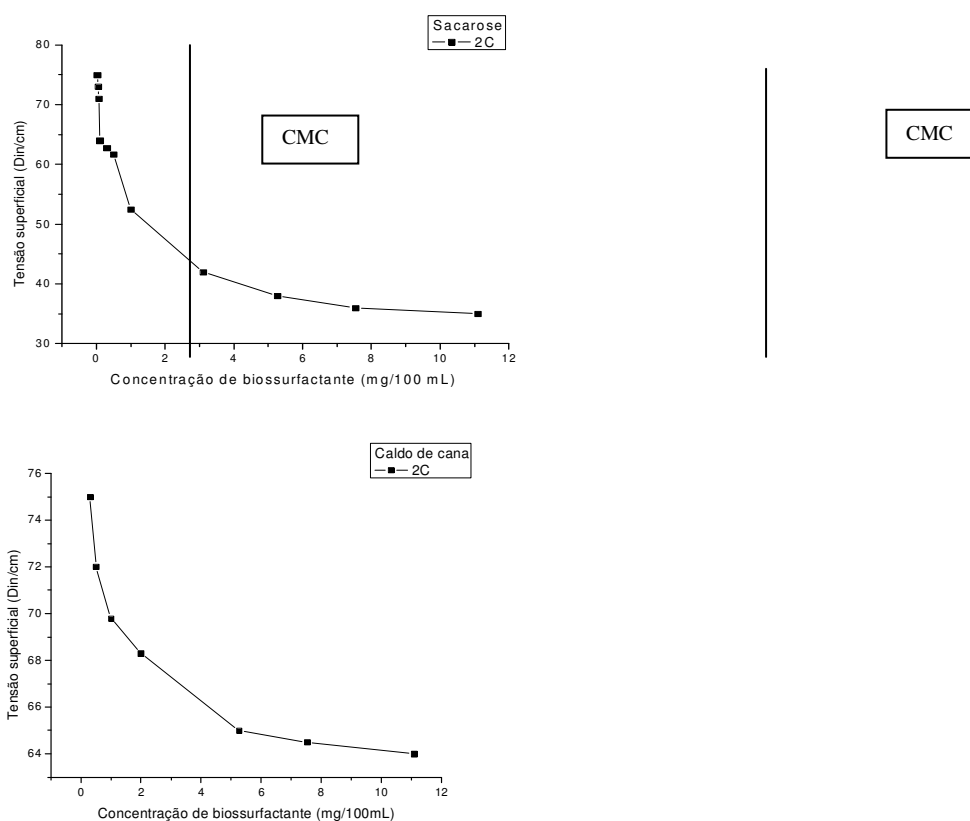


Figura 9. Determinação da concentração micelar crítica (CMC) no sobrenadante livre de células do *Bacillus* sp (2C) em sacarose e caldo de cana.

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração do surfactante que favorece a formação de micelas, uma agregação entre 50 e 100 moléculas de surfactante formam micelas (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

A Figura 9 mostra a determinação da CMC para o *Bacillus* sp 2C em sacarose e caldo de cana, por meio desta é possível observar que a CMC é de 27-37 mg/L. Segundo Mesquita (2004) quanto mais baixa a CMC melhor é o surfactante, a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* apresenta um CMC de 23 mg/L sendo considerado um ótimo biossurfactante (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002). Por este motivo foi realizada a produção em maior escala utilizando o *Bacillus* sp 2C em sacarose a 2% em pH = 7,0, 72 horas de incubação a 30°C e 200 rpm, pois estas foram as melhores condições de produção de biossurfactante e a melhor bactéria produtora. Após a retirada das células por centrifugação, o sobrenadante foi submetido a precipitação com etanol na concentração 1:2 a 4°C (Fotografia 7) e foi realizado o cálculo do rendimento em relação a fonte de carbono. Para isto, o biossurfactante foi seco em estufa a vácuo a 45°C e o rendimento foi calculado com relação a 1 L de caldo de fermentação. O resultado mostrou que a produtividade foi de 6,05 g/L correspondendo um rendimento de 30,25 %.



Fotografia 7. Biossurfactante obtido por precipitação com etanol a 4°C.

O biossurfactante foi purificado por meio de diálise (membrana de diâmetro 2,5 cm e poro de 10 kDA) por 72 horas na qual foi trocada a água três vezes ao dia (Fotografia 8). O biossurfactante foi submetido a determinação de proteína, gordura e carboidratos e enviado para análise de ressonância nuclear magnética (RMN).

A presença de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo Joslyn (1970), a análise da presença de gordura por Bligh-Dyer (1959) e açúcares redutores e açúcares redutores totais por Somogy-Nelson (1952; 1944) e Dubois; Gilles; Hamilton (1956).



Fotografia 8. Diálise para a purificação do biossurfactante.

A RMN é uma técnica espectroscópica que usa radiação na região de frequência do rádio para a produção do espectro eletromagnético, que pode ser usado na análise do surfactante para a determinação de seus componentes. O isótopo dominante de hidrogênio, ^1H , é o mais ativo para a determinação e a análise se denomina $^1\text{H-NMR}$ em 270 MHz. O TSP- d_4 (trimetilsililtetradepropanato de sódio) é utilizado como padrão interno para análise (CULLUM, 1994).

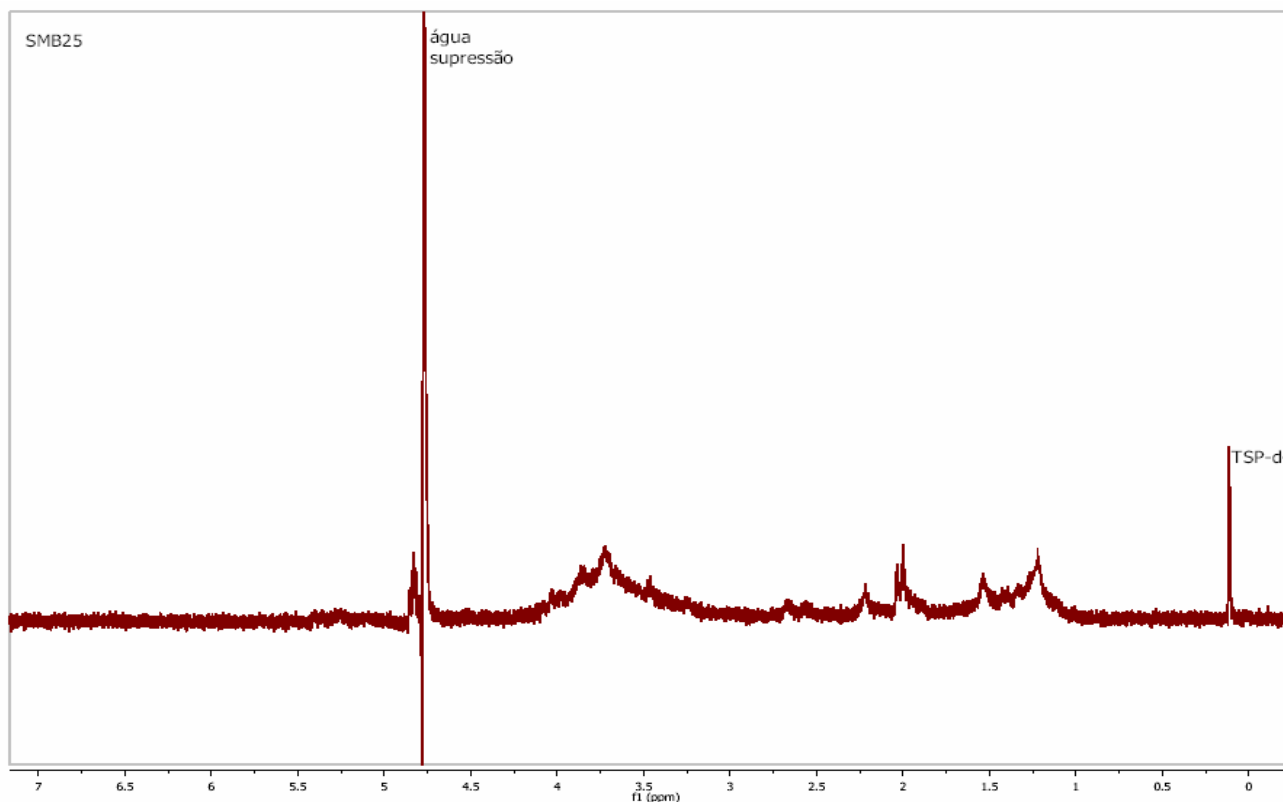


Figura 10. Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) do biossurfactante.

Da Figura 10 podem-se observar picos na região de 3,2-3,8 ppm indicando a presença de $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n$ e $(\text{CH}_2\text{-CHO-CH}_3)_n$ picos na região de 1,2 ppm indica a presença de $(\text{CH}_2)_n$ na estrutura do biossurfactante. O pico localizado na região de 2 ppm está correlacionado com o solvente. Entre os compostos presentes estão carboidratos, lipídeos e proteínas.

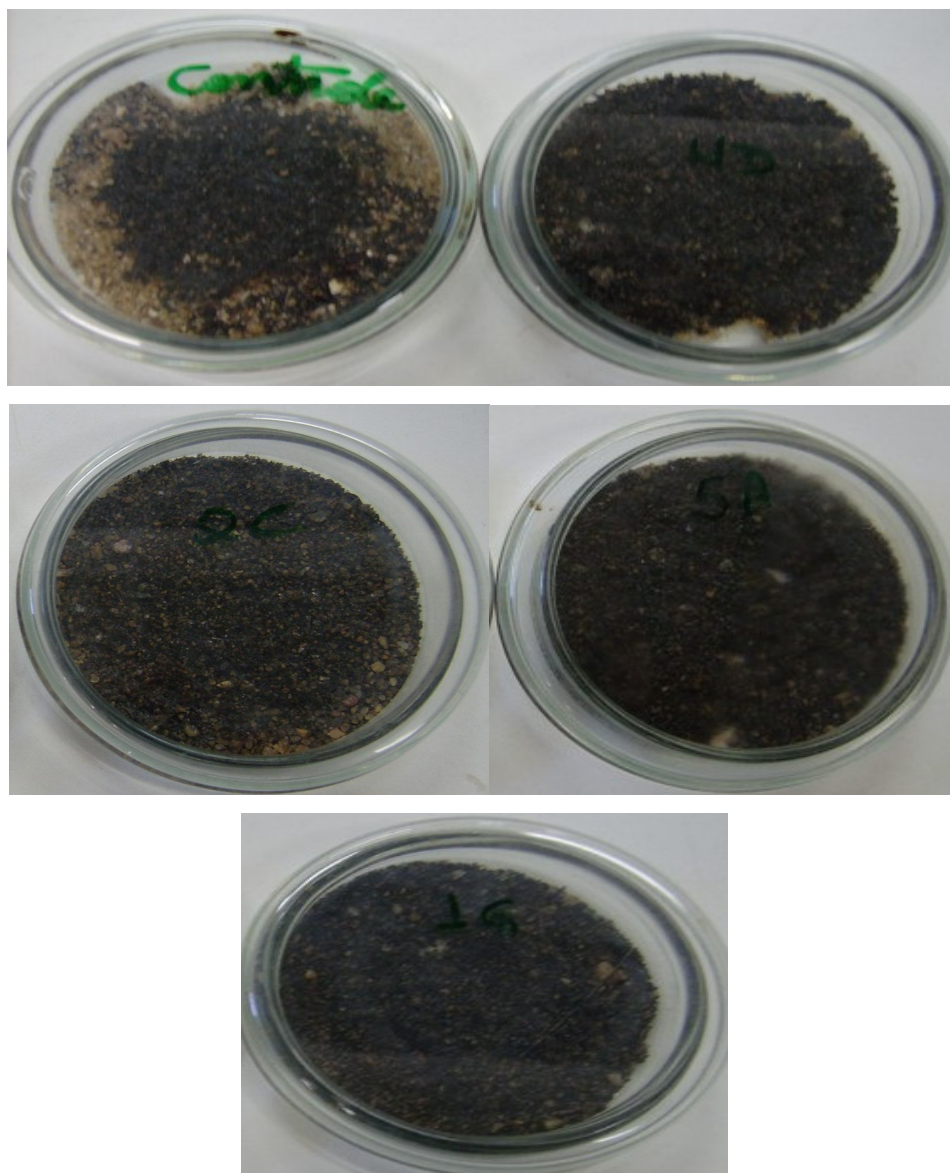
Nas análises individuais de proteínas, lipídeos e carboidratos foram constatadas as presenças de 5% de proteínas, 8% de lipídeos e 80,4% de açúcares redutores totais indicando que a molécula de biopolímero tem alto peso molecular e está formada por um complexo lipopolissacarídeo-proteína. Em geral, estes tensoativos de alto peso molecular estão associados a produção de emulsão. Camargo-de-Morais *et al.* (2003) utilizou estas mesmas análises de identificação em seu trabalho para determinar a composição de um biossurfactante produzido por *Penicillium citrinum*.

Para a determinação da espécie do *Bacillus* sp identificado como 2C, o mesmo foi encaminhado a um centro especializado onde foi identificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) através do gene RNA ribossomal 16S e confirmou-se a presença da espécie *Bacillus pumilus*.

A identificação do *Bacillus pumilus* como produtor de um biossurfactante composto de carboidrato-lipídeo-proteína de alto peso molecular é extremamente importante pois dados literários não indicam este tipo de composto produzido por *Bacillus* sp e sim biossurfactantes lipoprotéicos como a surfactina, iturina e bacilomicina e glicolipídeos como ramnolipídeos (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Além disso não foram encontrados dados literários sobre a produção de tensoativos por *Bacillus pumilus*.

5.4. Estudo da fluidez do petróleo

Para o estudo da fluidez do petróleo, os quatro *Bacillus* sp selecionados (1G, 2C, 4D e 5A) foram incubados a 30°C por 20 dias em placas de Petri contendo 10 g de areia, 2% de inóculo bacteriano e 1% de petróleo sendo o controle negativo realizado sem inóculo. Após este período as placas foram analisadas macroscopicamente para observação da degradação do petróleo e os resultados estão mostrados nas Fotografias 9 e 10. Nestas pode-se observar que os *Bacillus* sp testados (1G, 2C, 4D e 5A) atuam sobre o petróleo bruto deixando-o mais fluído, sugerindo que os biossurfactantes produzidos poderiam ser utilizados na limpeza das incrustações nos tanques de armazenamento e oleodutos nas empresas de petróleo e nos derramamentos no meio ambiente. Este teste de degradação do petróleo também foi realizado por Gouveia *et al.* (2003) que também obteve resultado semelhante com inóculo bacteriano.



Fotografia 9. Análise macroscópica da fluidez do petróleo.



CONTROLE



2C



Fotografia 10. Análise macroscópica da fluidez do petróleo na presença dos inóculos bacterianos.

5.5. Determinação da atividade antimicrobiana

Vários biossurfactantes apresentam atividade antimicrobiana como os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, lipopeptídeos produzidos

por *Bacillus subtilis* e glicolipídeos produzidos por *Rhodococcus erythropolis* (LANG & PHILP, 1998; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Neste trabalho foi realizada a determinação da atividade antimicrobiana dos *Bacillus* sp.

Para a determinação desta atividade foram testados os *Bacillus* sp selecionados e seus respectivos sobrenadantes (após fermentação por 72 horas, fonte de carbono sacarose a 2% e separação das células) contendo o biossurfactante. Foram utilizados os sobrenadantes produzidos nos caldos de fermentação com pH = 5 e 7, pois estes dois pH foram os melhores para a produção de biossurfactantes.

Nenhuma dos quatro *Bacillus* sp e seus sobrenadantes, produzidos nos caldos de fermentação com pH=5,0 e 7,0, inoculados nas placas de Petri, apresentaram halos de inibição, indicando que não possuem atividade antibacteriana e antifúngica sobre os microrganismos testados.

Com relação aos testes em tubos de ensaio, que é mais sensível, foi observada atividade bacteriostática e fungistática dos sobrenadantes produzidos nos caldos de fermentação a pH = 7,0 dos *Bacillus* sp 2C, 4D, 5A para todas as bactérias e o fungo testados. Esta atividade foi observada pela diminuição da leitura de densidade óptica quando esta foi comparada a leitura realizada nas soluções destes microrganismos sem a presença de biossurfactante.

5.6. Determinação do efeito do biossurfactante num sistema modelo sal-vinagre-azeite

Foram realizados ensaios práticos utilizando o biossurfactante purificado num sistema modelo formado por sal, vinagre e azeite com intuito de imitar um molho para salada. As proporções foram determinadas com base no planejamento fatorial completo 3**(3-0), com auxílio do programa Statistica 7 mostrado na Tabela 12, onde manteve-se constante o volume de 3,5 mL de biossurfactante.

Tabela 12. Delineamento experimental dos ensaios para um sistema modelo sal-vinagre-azeite.

Ensaio	Sal (g)	Azeite (mL)	Vinagre (mL)
1	0,01	2	2

2	0,01	2	5
3	0,01	2	8
4	0,01	5	2
5	0,01	5	5
6	0,01	5	8
7	0,01	8	2
8	0,01	8	5
9	0,01	8	8
10	0,055	2	2
11	0,055	2	5
12	0,055	2	8
13	0,055	5	2
14	0,055	5	5
15	0,055	5	8
16	0,055	8	2
17	0,055	8	5
18	0,055	8	8
19	0,1	2	2
20	0,1	2	5
21	0,1	2	8
22	0,1	5	2
23	0,1	5	5
24	0,1	5	8
25	0,1	8	2
26	0,1	8	5
27	0,1	8	8

Os resultados estatísticos dos testes realizados estão apresentados na Figuras 11, 12, 13 e 14.

Regressão linear = 0,8368

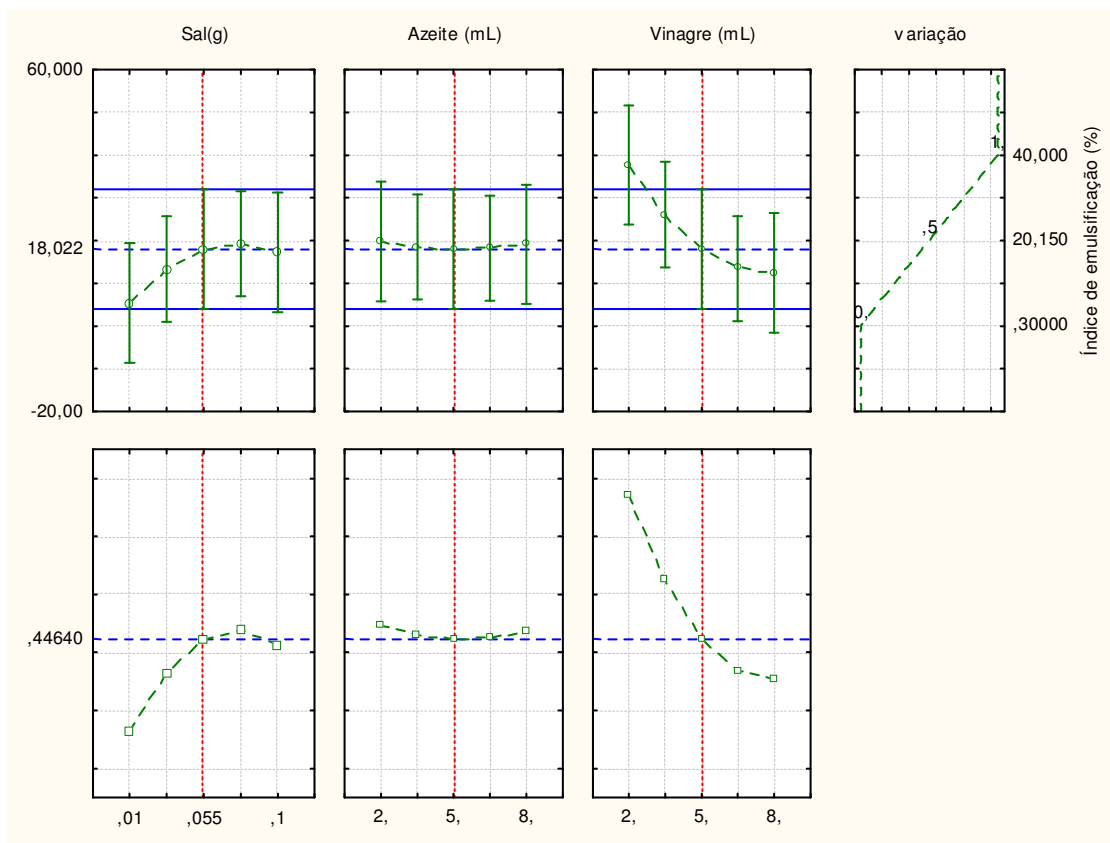


Figura 11. Dados estatísticos do delineamento experimental num sistema modelo sal-vinagre-azeite.

De acordo com a Figura 11 pode-se observar que apenas o volume de vinagre afeta o índice de emulsificação onde se encontrou um p de 0,002058 indicando elevada significância estatística. Assim observa-se que o índice de emulsificação diminui significativamente com o aumento da concentração do vinagre e com relação a variação da concentração de sal e de azeite, este permanece dentro da faixa, sendo suas variações de volume estatisticamente não significativas.

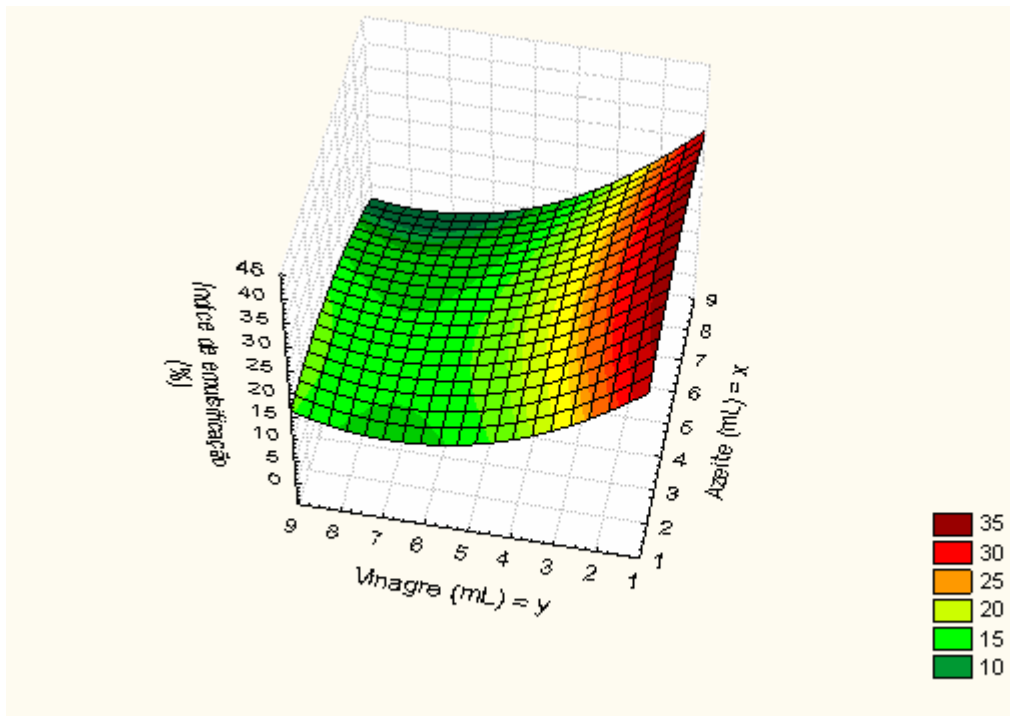


Figura 12. Superfície de resposta para a região ao redor dos valores ótimos de azeite e vinagre para o índice de emulsificação (índice de emulsificação (%) = $36,7436 + 2,6596*x - 7,6484*y - 0,2531*x*x - 0,1417*x*y + 0,5819*y*y$).

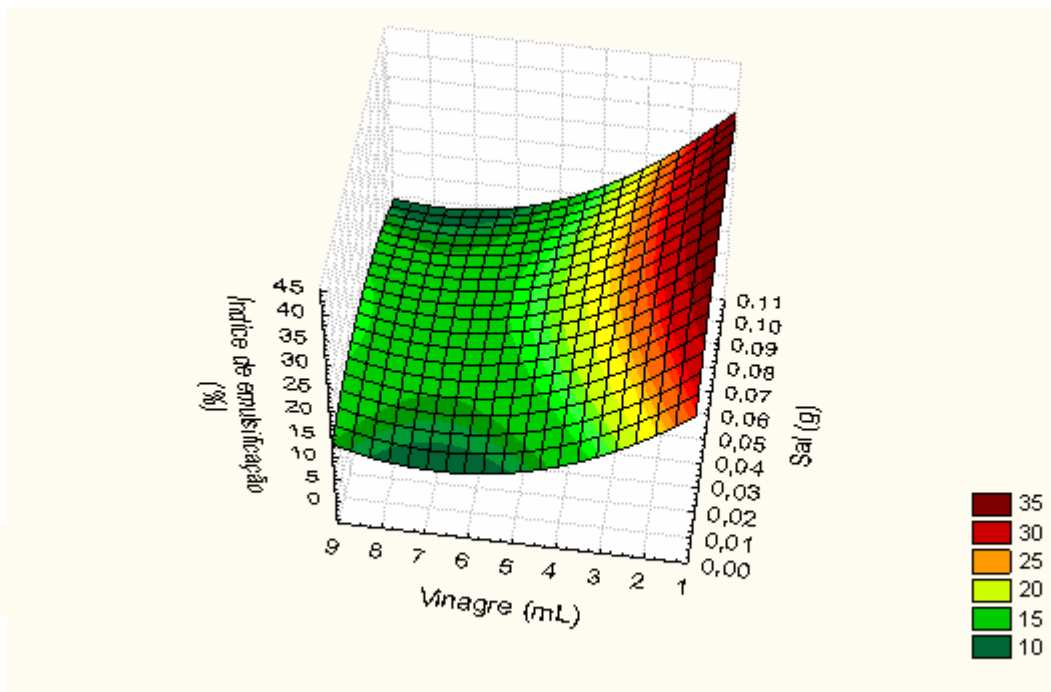


Figura 13. Superfície de resposta para a região ao redor dos valores ótimos de vinagre e sal para o índice de emulsificação (índice de emulsificação (%) = $34,8059 + 273,5274*x - 7,6733*y - 1749,5199*x*x - 12,4259*x*y + 0,5819*y*y$).

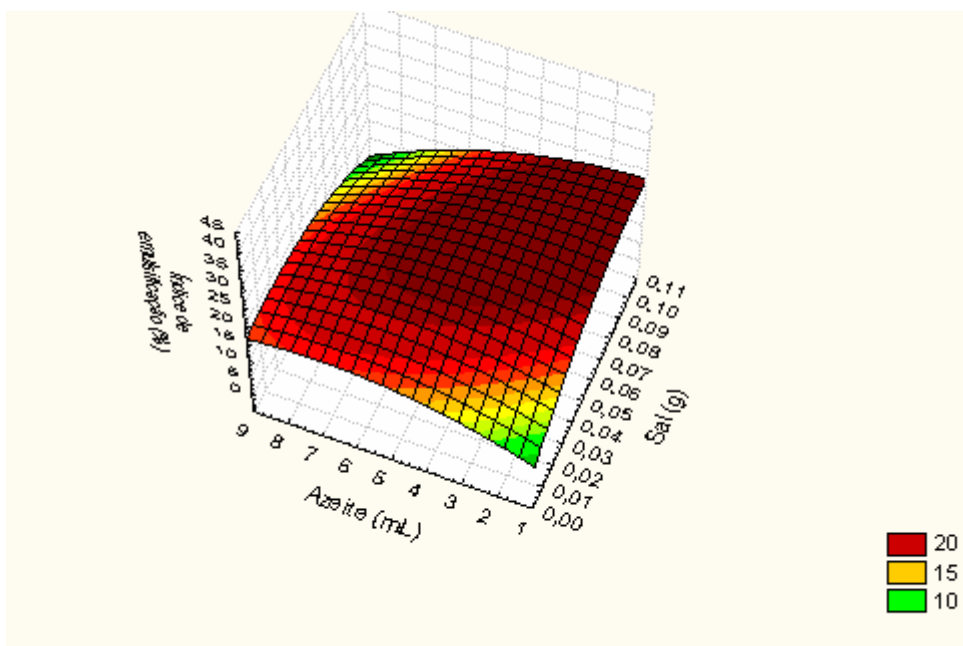


Figura 14. Superfície de resposta para a região ao redor dos valores ótimos de azeite e sal para o índice de emulsificação (índice de emulsificação (%) = $4,3607 + 360,6262*x - 3,5927*y - 1749,5199*x*x - 29,8457*x*y + 0,2531*y*y$).

As Figuras 12, 13 e 14 mostram os gráficos de superfícies de resposta. Nestes observa-se que a variação de azeite e sal não interferiu significativamente no índice de emulsificação. Nestas Figuras pode-se também observar que o índice de emulsificação é melhor em baixas concentrações de vinagre, na qual este interfere na capacidade emulsificante do biossurfactante. Estes dados confirmam as observações realizadas na Figura 11 com relação ao estudo de significância estatística do sistema modelo.

Por meio dos dados experimentais foi possível mostrar que o biossurfactante produzido pela bactéria 2C pertencente a espécie *Bacillus pumilus* apresenta índices de emulsificações estáveis, sendo um ótimo emulsificante em molhos para salada, ficando seu uso restrito apenas em temperos com altos índices de vinagre.

6. CONCLUSÕES

Foram isoladas quatro bactérias produtoras de biossurfactantes de solos contaminados e não-contaminados com hidrocarbonetos os quais foram identificado o gênero *Bacillus* sp.

A melhor produção de biossurfactantes foi obtida nos pH 5,0 e 7,0 após 72 horas de fermentação utilizando como fontes de carbono sacarose em baixas concentrações. A melhor produtora foi a bactéria identificada como *Bacillus pumilus*.

Na análise da composição centesimal do biossurfactante constatou a presença de uma molécula de biopolímero de alto peso molecular formada por um complexo lipopolissacarídeo-proteína.

Os quatro *Bacillus* sp testados foram capazes de atuarem sobre o petróleo bruto fazendo com que este ficasse mais fluído, podendo ser utilizadas nas empresas de petróleo e na biorremediação do meio ambiente.

Os quatro *Bacillus* sp estudados não apresentaram atividade antimicrobiana ou antifúngica. Os *Bacillus* sp 2C, 4D e 5A apresentaram atividade bacteriostática e fungistática sobre todas as bactérias e o fungo testados utilizando seus sobrenadantes a pH = 7,0.

Os ensaios realizados num sistema modelo sal-vinagre-azeite, mostraram que o biossurfactante obtido pode ser usado como emulsificante em molhos de salada levando em consideração a concentração de vinagre.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAGLI, S. Da Biodiversidade a Biotecnologia: A Nova Fronteira da Informação. **Ciência e Informação**, v. 27, n.1, p. 7-10, Jan./Abr. 1998.

ANISZEWSKI, E.; TAKETANI, R.G.; ARAUJO, F.V.; ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. F. Microbial Production of Biosurfactants Using Different Carbon Source. **5 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5 p. 495-508, 2000.

BARKAY, T. NAVON-VENEZIA, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhancement of Solubilization and Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by the Bioemulsifier Alasan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.6, p. 2697-2702, 1999.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA- JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicação em Alimentos. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 409-414, 2007.

BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. R. KRIEG. Ed. Baltimore, Williams Wilkins, v.1 e 2, 964 p., 1984.

BERSELLI, S.; BENITEZ, E.; FEDI, S.; ZANNONI, D.; MEDICI, A.; MARCHETTI, L.; FAVA, F. Development and Assessment of an Innovative Soil-Washing Process Based on the Use of Cholic Acid-Derivatives as Pollutant-Mobilizing Agents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 4, 5, p. 761-770, mar. 2006.

BICCA, F.C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of Biosurfactant by Hydrocarbon Degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 8, p. 231-236, 1999.

BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A rapid method of total lipids. Extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

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, p. 273-280, 1998.

BOGNOLO, G. Biosurfactant as Emulsifying Agent for Hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, A.; SOUBES, M. Production and Characterization of a New Bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 456-463, 2005.

BOVING, T. B.; BRUSSEAU, M. L. Solubilization and Removal of Residual Trichloroethene from Porous Media: Comparison of Several Solubilization Agents. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 42, p. 51-67, 2000.

BRAUD, A.; JÉZÉQUEL, K.; LÉGER, M.; LEBEAU, T. Siderophore Production by Using Free and Immobilized Cells of Two Pseudomonads Cultivated in a Medium

Enriched with Fe and/or Toxic Metals (Cr, Hg, Pb). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p.1080-1088, ago., 2006.

BUENO, S. M. Isolamento e Caracterização de Bactérias Produtoras de Polissacarídeos Obtidas de Amostra de Solo da Estação Ecológica de São José do Rio Preto - SP. **Dissertação de Mestrado**, 141 p., 2001.

CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; RAMOS, S. A. F.; PIMENTEL, M. C. B.; DE MORAIS JR., M. A.; LIMA FILHO, J. L. Production of an Extracellular Polysaccharide With Emulsifier Properties by *Penicillium citrinum*. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 191- 194, 2003.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* Under Denitrification: Effects of Limiting Nutrients and Carbon Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 25-33, jan. 2001.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

COSTA, S. G. V. A.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI Rhamnolipids Following Growth on Brazilian Native Oil. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

COELHO, J.; RIVONKAR, C. U.; BHAVESH, N. S.; JOTHI, M.; SANGODKAR, U. M. X. Biosurfactants Production by the Quinoline Degrading Marine Bacterium *Pseudomonas sp* Strain GU 104, and its Effect on the Metabolism of Green Mussel *Perna Viridis* L. **Indian Journal of Marine Sciences**, v.32, p. 202-207, 2003.

CULLUM, D. C. Introduction Surfactant Analysis, Ed. Springer, 376p. 1994.

CYBULSKI, Z.; DZIURLA, E.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. The Influence of Emulsifiers on Hydrocarbon Biodegradation by Pseudomonadacea and

Bacillacea Strains. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 8, n. 5-6, p. 503-507, 2003.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. rhlA is Required for the Production of a Novel Biosurfactant Promoting Swarming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy) alkanolic Acids (HAAs), the Precursors of Rhamnolipids. **Microbiology**, v. 149, p. 2005-2013, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric Method for Determination Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FIECHTER, A. Biosurfactants: Moving Towards Industrial Application. **Trends Biotechnology**, v. 10, n. 6, p.208-217, 1992.

FLEURACKERS, S. J. J. On The Use of Waste Frying Oil in The Synthesis of Sophorolipids. **Europe journal Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 5-12, 2006.

GARCIA, E. S. O Valor dos Microrganismos. **Caderno de Saúde Pública**, v. 11, n. 3, jul/set. 1995.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology - a Sustainable Alternative for Chemical Industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 471-499, 2005.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-Active Compounds from Microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, J. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. **Biociência e Desenvolvimento**, n. 30, jan/jun, p. 39-45, 2003.

GREEK, B. F. Detergent Industry Ponders Product for New Decade. **Chemical Engineering News**, v. 68, p. 37-38, 1990.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from Waste Frying Oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R.; MANRESA, A. Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p.316-322, feb. 2003.

HONG, K.; TOKUNAGA, S.; KAJIUCHI, T. Evaluation of Remediation Process With Plant-Derived Biosurfactant for Recovery of Heavy Metals from Contaminated Soils. **Chemosphere**, v. 49, p. 379-387, 2002.

HUA, Z. Z.; CHEN, J.; LUN, S. Y. Production of Biosurfactant and Degradation of *n*-Alkanes by *Candida antarctica* . **Journal of Nanjing University**, v. 34, p. 149-154, 1998.

HUA, Z. Z.; CHEN, J.; LUN, S. Y.; WANG, X. Influence of Biosurfactants Produced by *Candida antarctica* on Surface Properties of Microorganism and Biodegradation of *n*-Alkanes. **Water Research**, v. 37, p. 4143-4150, 2003.

HUA, Z.Z.; CHEN, Y.; DU, G.; CHEN, J. Effects of Biosurfactants Produced by *Candida antarctica* on the Biodegradation of Petroleum Compounds. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 25-29, 2004.

HUDAK, A. J.; CASSIDY, D. P. Stimulating In-Soil Rhamnolipid Production in a Bioslurry Reactor by Limiting Nitrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, December 30, p.861-868, 2004.

JENNINGS, E. M.; TANNER, R. S. Biosurfactant - Producing Bacteria Found in Contaminated and Uncontaminated Soils. **Conference on Hazardous Waste Research**, 2000.

JOSLYN, M. A. Methods in food analysis (Physical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis). Nova York e Londres: Academic Pres, 1970.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 84, p. 41-46, 1997.

KIM, S.K.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and Characterization of Biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnonology Applied and Biochemistry**, v. 31, p.249-253, 2000.

KIM, H. S.; JEON, J. W.; KIM, S. B.; OH, H. M.; KWON, T. J.; YOON, B. D. Surface and Physico-Chemical Properties of a Glycolipid Biosurfactant, Mannosylerythritol Lipid, from *Candida antartica*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1637-1641, 2002.

KREPSKY, N.; DA SILVA, F. S.; FONTANA, L. F.; CRAPEZ, MAC. Alternative Methodology for Isolation of Biosurfactant-Producing Bactéria. **Brazilian Journal Biology**, v. 67, n.1, p. 117-124, 2007.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J. P.; LAMERS, G. E. M.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Characterization of Two *Pseudomonas putida* Lipolpeptide Biosurfactants, Putisolvin I and II, Which Inhibit Biofilm Formation and Break Down Existing Biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 97-113, 2004.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C. Recovery of Rhodococcus Biosurfactants Using Methyl Tertiary-Butyl Ether Extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, p. 149-156, 2001.

LANG, S.; PHILP, J. Surface-active Lipids in Rhodococci. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 59-70, 1998.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

LE CLAINCHE, L.; FIGUET, M.; MONTJARDET-BAS, V.; BLANCHARD S.; VITA, C. Modulating the Affinity and the Selectivity of Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides for Lanthanides. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 1, p. 29-36, sep. 2006.

LIN, S. C. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal Chemistry Tecnology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LINHARDT, R. J.; BARHIT, R.; DANIELS, R.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially Produced Rhamnolipid as a Source of Rhamnose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1989.

LYNCH, J. M. Biotecnologia do Solo: Fatores Microbiológicos na Produtividade Agrícola – S. P. Ed. Manole, 209 p., 1986.

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potencial Applications. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Anupdate on the Use of Unconventional substrates for Biosurfactant Production and their New Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MARÇANO, M. M.; VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F. Influência do Biossurfactante na Utilização de Naftaleno em Presença de Cádmiu. **5 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003.

MATHEW, M.; TAN, L. R.; SU, Q.; YANG, X.; BAXTER, M.; SENIOR, E. Bioremediation of 6% [w/w] Diesel-Contaminated Mainland Soil in Singapore; Comparison of Different Biostimulation and Bioaugmentation Treatments. **Engineering Life Science**, v. 6, n.1, p. 63-67, 2006.

MESQUITA, A. C. Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes. **Tese de Doutorado**, UFRJ. 158 p. 2004.

MOLINA-BARAHONA, L.; VEJA-LOYO, L.; GUERRERO, M.; RAMÍREZ, S.; ROMERO, I.; VEJA-JAQUIN, C.; ALBORES, A. Ecotoxicological Evaluation of Diesel-Contaminated Soil Before and after a bioremediation Process. **Wiley InterScience**, p. 100-109, 2005.

MULLER, A.; RUSSEL, G.; LUCASE, P. A New Economy. The Fourth Annual Ernst and Young Report on the European Biotechnology Industry. **European Biotechnology**, Oxford Business Publishing, Oxford, 1997.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. On The Use of Biosurfactants for The Removal of Heavy Metals from Oil-Contaminated Soil. **Process Safety Progress**, v. 18, n.1, p. 50-54, 1999.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-Enhanced Remediation of Contaminated Soil: a Review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-80, 2001.

MULLIGAN, C. N.; EFTEKHARI, F. Remediation With Surfactant Foam of PCP-Contaminated Soil. **Engineering Geology**, v. 70, p. 269-279, 2003.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NELSON, N. A Photometric Adaptation of Somogy Method for Determination of Glucose. **Biochemistry**, v.153, p.375-380, 1944.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.

NOORDMAN, W. H.; JI, W.; BRUSSEAU, M.L.; JANSSEN, D. B. Effects of Rhamnolipid Biosurfactants on Removal of Phenanthrene from Soil. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 12, p. 1806-1812, 1998.

PALA, D. M. Estudo da Biorremediação de Solos Impactados por Óleo Cru . **Dissertação de Mestrado**, COPPE/UFRJ, 114p., 2002.

OPAS - MATERIAL IV- Glosario de Protección Civil, 1992.

PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F.; KOSARIC, N. Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. **Engineering Life Science**, v. 5, n. 4, p. 357-362, 2005.

PERFUMO, A.; CANGANELLA, F.; MANNA, F. Thermoresistant Microbial Biosurfactants for the Degradation and Emulsification of Crude Oil and Oil-Derivatives. **5 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003.

POREMBA, K.; GUNKEL, W.; LANG, S.; WAGNER, F. Marine Biosurfactant III. Toxicity Testing With Marine Microorganisms and Comparison With Synthetic Surfactants. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 46, p.210-216, 1992.

PRABHU, Y.; PHASE, P. S. Biodegradation of Phenanthrene by *Pseudomonas* sp. Strain PP2: Novel Metabolic Pathway, Role of Biosurfactant and Cell Surface Hydrophobicity in Hydrocarbon Assimilation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-21, 2003.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaluation of Paraffins Biodegradation and Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* in the Presence of Crude Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 321-324, 2003.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strain *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. **Biotechnology Program**, v. 18, p. 1277-1281, 2002a.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Occurrence of Crude Oil Degrading Bacteria in Gasoline and Diesel Station Soil. **Journal Basic of Microbiology**, v. 42, p. 284-291, 2002b.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Enhanced Bioremediation of *n*- Alkane in Petroleum Sludge Using Bacterial Consortium Amended With Rhamnolipid and Micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003a.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. The Potential of Bacterial Isolates for Emulsification with a Range of Hydrocarbons. **Acta Biotechnology**, v. 23, n.4, p. 335-345, 2003b.

RAJESHWARI, K. V., PRAKASH, G.; GHOSH, P. Improved Process for Xanthan Production Using Modified Media and Intermittent Feeding Strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p. 173-175, 1995.

REIS, F. A. S. L. Estudo da Síntese de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC6633. **Dissertação de Mestrado**, UFRJ, 107f. 1998.

ROCHA, J. M. S. Aplicações de Agentes Tensoactivos em Biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, p. 5- 11. 1999.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and Oil Bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA- HAGLER, L. C. A Moderna Microbiologia do Solo: **Aplicações de Técnicas de Biologia Celular**, 20 p., 1999.

ROSEN, M. J. Surfactants and Interfacial Phenomena. **John Wiley and Sons, New York**, 1978.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioemulsans: Microbial Polymeric Emulsifiers. **Current Opinion Biotechnology**, v. 8, p. 313-316, 1997.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and Low- Molecular-Mass Microbial Surfactant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROY, D.; KOMMALAPATI, R. R.; MANDAVA, S. S.; Soil Washing Potential of a Natural Surfactant. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 670-675, 1997.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Biosurfactant Production by *Candida lipolytica* Using Corn Oil as Substrate. **5 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier Obtained from a New Strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 400-406, jul. 2006.

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactant. **Indian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 165-184, 1995.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of Metal Bioremediation by Use of Microbial Surfactants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, p. 291-297, 2004.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 195, p. 19, 1952.

STRELEC, T.; ALMEIDA, N.R.F.; MONTEMOR, A.F.; ALLI, R.C.P.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C. Isolamento de Microrganismos Produtores de Biossurfactantes. **5 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003.

SULLIVAN, E. Molecular Genetics of Biosurfactant Production. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 9, p. 263-269, 1998.

TOREN, A.; SEGAL, G.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Structure-Function Studies of the Recombinant Protein Bioemulsifier AlnA. **Environmental of Microbiology**, v.4, n.5, p. 257-261, 2002.

TORRENS, J. L.; HERMAN, D. C.; MILLER-MAIER, R. M. Biosurfactant (Rhamnolipid) Sorption and Impact on Rhamnolipid-Facilitated Removal of Cadmium from Various Soils Under Saturated Flow Conditions. **Environmental Science & Technology**, v.32, n. 6, p. 776-781, 1998.

VANCE-HARROP, M. H.; GUSMÃO, N. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. New Bioemulsifiers Produced by *Candida lipolytica* Using D-Glucose and Babassu Oil as Carbon Sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 120-123, 2003.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; VAN ANDEL, J. G.; RULKENS, W. H. Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Applied Environmental of Microbiology**, v. 61, p. 1699-1705, 1995.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 44-49. 1997.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid Production by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 Originating from Petrochemical Wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

ZHANG, J.; LEE, S.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. Surface Properties of Emulsan-Analogs. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n.74, p. 759-765, 1999.