

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Eduardo Francisco dos Santos

**Produção, caracterização e aplicação biológica do biossurfactante
por *Streptomyces* spp. isolados da Região Amazônia**

**RECIFE
2012**

Eduardo Francisco dos Santos

**Produção, caracterização e aplicação biológica do biossurfactante
por *Streptomyces* spp. isolados da Região Amazônia**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biociência Animal como pré-
requisito parcial para obtenção do Grau de
Doutor em Biociência Animal

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Orientadora: **Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto**

Co-Orientadora: **Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo**

**RECIFE
2012**

Ficha catalográfica

S237p Santos, Eduardo Francisco dos
Produção, caracterização e aplicação biológica do
biossurfactante por *Streptomyces* spp. isolados da
região amazônica / Eduardo Francisco dos Santos. -- Recife,
2012.
158 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) –

Universidade

Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2012.
Inclui referências e anexo.

1. Biossurfactante 2. *Streptomyces* 3. Mastite I.
Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 636.089

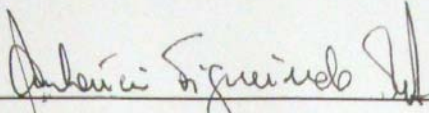
EDUARDO FRANCISCO DOS SANTOS

Produção, caracterização e aplicação biológica do biossurfactante por *Streptomyces* spp. isolados da Região Amazônia.

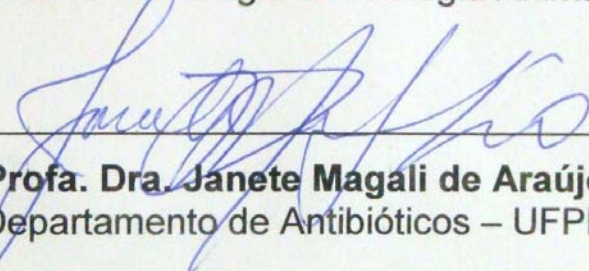
Tese apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal – Área de Concentração Biotecnologia, para a obtenção do Título de Doutor.

Tese Aprovada em 23 de março de 2012

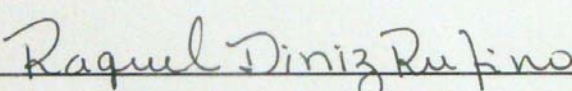
Banca Examinadora



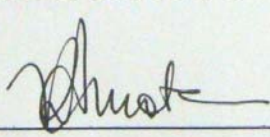
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE



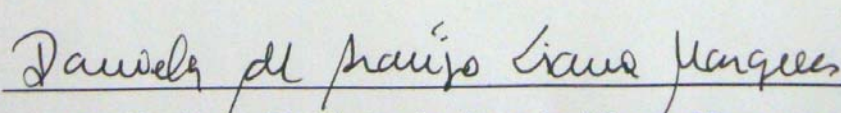
Profa. Dra. Janete Magali de Araújo
Departamento de Antibióticos – UFPE



Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino
Departamento de Ciência e Tecnologia – UNICAP



Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE



Profa. Dra. Daniela de Araujo Viana Marques
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Dedico

Ao soberano Deus.

À minha amada mãe Maria da Paz e ao meu Pai Severino por seu infinito amor.

À minha esposa Maria de Fátima e meus filhos Ieda Fernanda, Diogo Fernando e Ávila Fernanda por serem as jóias raras em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Trindade Santa – Pai, Filho e Espírito Santo pela vida e pelo sol. A Nossa Senhora por sua presença suave e serena.

À minha mãe Maria da Paz de Araujo dos Santos pelo exemplo de mulher e pelo amor incondicional e ao meu pai Severino Francisco dos Santos pelo amor zeloso. A minha linda querida e eterna Vovó Alexandrina. Que alma pura. Mulher perfeita espiritualmente.

Em especial a minha queridíssima Fauzinha – minha Esposa e meus filhos Iêda, Diogo e Ávila, pelo carinho, afeto, espiritualidade Divina e Mariana, sabedoria e amor. Sou um homem feliz, pois tenho uma linda mulher e uma linda família.

Aos meus irmãos Severino Junior, Maria José, Evandro Francisco, Alcir Roberto e Franciscleide Santos pela fraternidade emanada em nossas vidas.

Aos meus cunhados pela nobreza de espírito e solidariedade para com minha família em minha ausência.

Da vida pela vida, nasceram dois seres de sabedoria divina, fraternas, humanas por demais, as Professoras Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora) e a Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Co-orientadora). Quanto conhecimento e entendimento no processo de formação do Doutorado. Serei eternamente grato.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela acolhida e a todos os professores que formam o Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, em especial a Porfa. Dra. Tatiana Souza Porto.

Aos Técnicos Geison e Ieda pelo companheirismo, colaboração e apoio nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alexandre Schuler da UFPE, Profa. Mestra Ítala Viviane do IFRN e Júlia Furtado do CETENE pela colaboração e a atenção.

A toda equipe gestora do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco - IFPE pela oportunidade e valorização profissional e a todos os colegas professores e técnicos administrativos.

Aos colegas do grupo de pesquisa Ana Porto e de Leonie Sarubbo (IC, Mestrandos, Doutorandos e Pós-Doutores) pela valiosa troca de experiência e conhecimento. Serei sempre grato.

Deus esteja com todos. Obrigada.

RESUMO

Os biossurfactantes são biomoléculas anfifílicas produzidas por micro-organismos e são capazes de diminuir a tensão superficial entre líquidos, pouco tóxicos, biodegradáveis, apresentam atividade antimicrobiana e são aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Foi avaliada a capacidade de produção de biossurfactante por quarenta e um *Streptomyces* spp. da coleção DPUA isolados da região Amazônica utilizando substratos orgânicos agroindustriais de baixo custo. Os micro-organismos foram cultivados em diferentes meios para avaliação da produção de biossurfactante. Os meios utilizados na seleção foram: meio A (peptona e glicerol) e meio B (peptona/extrato de levedura e óleo de *Caryocar brasiliense*). Outros quatro meios foram utilizados para selecionar os melhores resíduos agroindustriais: meio I (milhocina e óleo de soja), meio II (milhocina e óleo de soja residual de frituras), meio III (peptona e óleo de motor residual), meio IV (peptona e óleo de soja residual de frituras). A produção do biossurfactante foi verificada pela redução da tensão superficial (TS) e os valores do índice de emulsificação (IE) do biossurfactante bruto. Dois planejamentos fatoriais 2^4 foram realizados para verificar os efeitos e interações do pH, temperatura, agitação, relação do volume do meio e do volume do Erlernmeyer (RVME) concentração de milhocina, óleo de soja residual de frituras e inóculo sobre as variáveis resposta da TS, IE e rendimento em biossurfactante. O biossurfactante foi concentrado, isolado e caracterizado por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier e cromatografia gasosa. Dos 41 isolados de *Streptomyces* spp. 24,39% (dez) foram selecionadas e entre elas a melhor produtora de biossurfactante foi o *Streptomyces* sp. DPUA1566. O meio de cultivo II, temperatura de 28°C, pH 7,0, agitação de 150 rpm, 4% de inóculo e RVME de 90% foram designadas como condições ótimas para a produção de biossurfactante. O biossurfactante apresentou estabilidade durante a exposição a altas temperaturas, salinidade de até 12% e diferentes valores de pH. O biossurfactante apresentou um rendimento de 3,11 g/L, uma concentração micelar crítica (CMC) de 0,08% e reduziu a tensão superficial da água de 72 para 28,77 mN/m. O biossurfactante apresentou 84% de proteínas, 15% de lipídeos e uma composição de ácidos graxos apresentando 4,1% de ácido palmítico (C:16-0), 1,4% de ácido palmitoléico (C:16-1), 4,1% ácido esteárico (C:18-0), 80% de ácido oleico (C:18-1) e 10% de ácido linoleico (C:18-2) e foi caracterizado como uma lipoproteína e denominada de Bioelan. Nos testes de atividade antimicrobiana o biossurfactante apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) variando de 15 mg/mL a 60 mg/mL e uma CBM de 30 mg/mL frente as estirpes de *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de mastite bubalina do Estado de Alagoas e não apresentou toxicidade frente à *Artemia salina*, *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleracea* L. Dessa forma, o Bioelan produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566, cultivada em meio de baixo custo representa um novo biossurfactante estável, pertencente ao grupo das lipoproteínas com propriedades potenciais para aplicação pelas indústrias farmacêuticas, cosméticos, alimentos e de produtos veterinários.

Palavras-chave: Biossurfactante, *Streptomyces*, Lipoproteína, Mastite, Búfala, Atimicrobiana

ABSTRACT

The biosurfactants are amphiphilic biomolecules produced by micro-organisms and are capable of reducing the surface tension between liquids, less toxic, biodegradable, exhibit antimicrobial activity and are used in pharmaceutical and cosmetic products. This study evaluated the ability to produce biosurfactant using low-cost organic substrate by *Streptomyces* spp. isolated from lichens in the Amazon region. The used mediums for selection were: peptone and glycerol (medium A) and peptone /yeast extract and *Caryocar brasiliense* oil (medium B). Four other medium were used to select the best agro-industrial residues: cornsteep liquor and soybean oil (medium I), cornsteep liquor, soybean waste frying oil (medium II), peptone and the waste oil motor (medium III), peptone and soybean frying waste oil (medium IV) were evaluated for the production of biosurfactant by microorganisms tests. The biosurfactant production was followed by measuring the surface tension and emulsification index. Two 2⁴ full factorial design were carried out to verify the effects and interactions of pH, temperature, relationship between medium volume and Erlenmeyer volume (RVME) and agitation, cornsteep liquor, waste frying soybean oil and inoculum concentration on maximum variation of ST, EI and yield. The biosurfactant was concentrated, isolated and characterized by Infrared Spectroscopy Fourier Transform (FT-IR) and gas chromatography (GC). Ten strains of *Streptomyces* spp. were selected and among the best biosurfactant producer was the *Streptomyces* sp. DPUA1566. The medium II, at 28 ° C, pH 7.0, 150 rpm, 4% inoculum concentration and RVME of 90% were designated as optimal conditions for the biosurfactant production. The biosurfactant showed stability when submitted at 90°C and thermal (4–120°C), pH (6–12) and tolerance under high salt concentrations (2–12%). The biosurfactant showed a yield of 3.11 g/L, critical micelar concentration (CMC) of 0.08%, and reducing the superficial tension of the water from 72 to 28.77 mN/m. Biosurfactant showed 85% protein and 15% lipids. The fatty acid composition revealed the presence of C16:0 - 4.9% (palmitic), C16:1 - 1.1% (palmitoleic), C18:0 - 4.0% (stearic), C18:1 - 80.0% (oleic) and C18:2 - 10.0% (linoleic acid). The biosurfactant was characterized as a lipoprotein called Bioelan. The biosurfactant did not show toxicity against *Artemia salina*, *Lactuca sativa* L. and *Brassica oleracea* L.. The evaluation of the antimicrobial activity of these compounds showed MIC ranging from 15 mg/mL to 60 mg/mL and CBM of 30 mg/mL against multiresistant strains *Staphylococcus aureus* isolates of buffalo mastitis from Alagoas state. The biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA1566 grown in culture medium of cost low represents a new stable surfactant, belonging to the lipoproteins group, with potential properties for use by pharmaceutical, cosmetic, food and veterinary productions.

Key Words: Biosurfactant, *Streptomyces*, Lipoprotein, Buffaloes, Mastitis, Antimicrobial

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 - Figura ilustrativa das estruturas químicas de alguns biossurfactantes (Fonte: NITSCHKE; PASTORE, 2002).....20
- Figura 2 - Figura ilustrativa da liberação de biossurfactante, formação de micelas e assimilação de hidrocarbonetos por bactérias e leveduras (Fonte: SANTOS, 2012).....22
- Figura 3 - Figura ilustrativa da produção de biossurfactante pela parede celular, formação de micelas e assimilação de hidrocarbonetos por bactérias e leveduras (Fonte: SANTOS, 2012).....23
- Figura 4 - Figura ilustrativa da bactéria *Streptomyces* sp. DPUA 1566 crescido na superfície do meio de cultivo agar ISP-2 (a) e em meio líquido ISP-2 (b) (Fonte: SANTOS, 2012)31
- Figura 5 - Representação esquemática do desenvolvimento da mastite em um úbere infectado (Fonte: VIGUIER et al. (2009).....33

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Curva de crescimento, pH, tensão superficial e produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 em meio de cultivo contendo milhocina e óleo de soja residual de frituras, após 144 horas (Fonte: SANTOS, 2012)63
- Figura 2 - Curva do índice de emulsificação do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 144 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)65
- Figura 3 - Diagrama de Pareto sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)67
- Figura 4 - Diagrama de Pareto sobre a variável índice de emulsificação para o óleo residual de motor do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012).....68
- Figura 5 - Diagrama de Pareto sobre a variável índice de emulsificação para o óleo de soja do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)69

CAPÍTULO III

- Figura 1 - Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis avaliadas sobre a tensão superficial do biossurfactante bruto produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012).....91
- Figura 2 - Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis avaliadas sobre o rendimento do biossurfactante bruto produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012).....92
- Figura 3 - Tensão superficial versus concentração do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 cultivada em meio suplementado com milhocina e óleo de soja residual de frituras (Fonte: SANTOS, 2012).....96
- Figura 4 - Índice de emulsificação em diferentes óleos vegetais e hidrocarbonetos do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1566 (Fonte: SANTOS, 2012).....98
- Figura 5 - Cromatograma da parte lipídica do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 cultivada em meio suplementado com milhocina e óleo de soja residual de frituras (Fonte: SANTOS, 2012)....100
- Figura 6 - Espectro FT-IR do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 (Fonte: SANTOS, 2012)101
- Figura 7 - Figura ilustrativa do espectro de Infravermelho do lipopeptídio produzido por *Bacillus licheniformes* JF-2 (Fonte: JENNY et al., 1991).....102
- Figura 8 – Figura ilustrativa da dispersão e agregação do óleo residual de motor pela ação do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566: (a) óleo não disperso; (b) dispersão e agregação do óleo residual de motor (Fonte: SANTOS, 2012).....102

CAPÍTULO IV

- Figura 1 - Valores da tensão superficial, pH, biomassa e rendimento de produção do biossurfactante Bioelan por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 960 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)120
- Figura 2 - Valores do índice de emulsificação do biossurfactante Bioelan presente no líquido metabólico livre de células de *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 960 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)121
- Figura 3 - Figura ilustrativa do teste de atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*(1) e *Pseudomonas aeruginosa* (2) utilizando o biossurfactante Bioelan através da técnica de difusão em discos (Fonte: SANTOS, 2012).....123

Figura 4 - Figura ilustrativa da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do biossurfactante Bioelan de *Streptomyces* sp. DPUA1566 após aplicação do corante resazurin frente as estirpes de *Staphylococcus aureus* multirresistentes isoladas de mastite bubalina subclínica. A concentração inibitória mínima (CIM) corresponde ao último poço azul da linha no sentido de cima para baixo (Fonte: SANTOS, 2012)124

Figura 5 - Figura ilustrativa da inibição do crescimento microbiano frente ao *Staphylococcus* coagulase positiva utilizando o biossurfactante Bioelan após teste de concentração inibitória mínima (CIM) (Fonte: SANTOS, 2012)124

CAPÍTULO VI

Figura 1 - Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis avaliadas sobre tensão superficial (a), índice de emulsificação - óleo do motor (b) e óleo de soja (c), do biossurfactante produzido por *Actinomyces* após 96 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2011)150

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes (Fonte: BANAT *et al.*, 2000).....27

Tabela 2 - Utilização de resíduos de baixo custo na produção de biossurfactantes por várias espécies de micro-organismos (Fonte: SANTOS, 2012)28

CAPÍTULO II

Tabela 1- Meios de cultivo para produção de biossurfactantes e suas composições a partir de resíduos industrial e agro-industriais (Fonte: SANTOS, 2012)...54

Tabela 2 - Valores e níveis das variáveis independentes utilizados no planejamento fatorial para produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. da coleção DPUA selecionado (Fonte: SANTOS, 2012)55

Tabela 3 – Tensão superficial do biossurfactante dos 41 isolados de *Streptomyces* spp. após 144 horas de cultivo nos meios (A) e (B) (Fonte: SANTOS, 2012)59

Tabela 4 - Valores da tensão superficial e rendimento em biossurfactante dos dez isolados de *Streptomyces* spp. DPUA em diferentes resíduos industriais e agroindustriais, após 144 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)61

Tabela 5 - Condições e resultados do planejamento fatorial completo 2⁴ selecionadas para produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 144 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012).....66

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Valores e níveis das variáveis independentes usados no planejamento fatorial para produção de biossurfactante (Fonte: SANTOS, 2012)85

Tabela 2 - Resultados do planejamento fatorial completo para produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)90

Tabela 3 - Estabilidade do biossurfactante para diferentes valores da concentração de sal, temperatura, pH e tempo de aquecimento a 90°C do líquido metabólico livre de células de *Streptomyces* sp. DPUA1566 (Fonte: SANTOS, 2012).....95

Tabela 4 - Composição em ácidos graxos do biossurfactante isolado produzido por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1566 (Fonte: SANTOS, 2012).....	102
---	-----

CAPÍTULO 6

Tabela 1 - Valores e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial, para produção de biossurfactante (Fonte: SANTOS, 2011)	147
---	-----

Tabela 2 - Condições e resultados do planejamento experimental 2^4 selecionado para a produção de biossurfactante (Fonte: SANTOS, 2011)	149
---	-----

ÍNDICE

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. Biossurfactantes.....	19
2.1.1. Classificação química dos biossurfactantes.....	19
2.1.2. Produção de biossurfactantes.....	21
2.1.3. Aplicações biológicas e terapêuticas.....	24
2.1.4. Aplicações industriais dos biossurfactantes.....	26
2.1.5. Utilização de resíduos industriais e agroindustriais.....	27
2.1.6. Micro-organismos produtores.....	30
2.2. Actinomicetos.....	31
2.3. Mastite.....	32
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivos Específicos.....	37
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE <i>STREPTOMYCES</i> SPP. ISOLADOS DE LIQUENS DA AMAZÔNIA PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS RESÍDUOS INDUSTRIAIS E AGRO-INDUSTRIAIS	47
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1. Reagentes.....	52
2.2. Micro-organismos.....	52
2.3. Meios de manutenção e inóculo.....	52

2.4. Seleção dos <i>Streptomyces</i> produtores de biossurfactante	53
2.5. Seleção de resíduo de baixo custo para produção do biossurfactante	54
2.6. Planejamento experimental e análise estatística	55
2.7. Curva de crescimento e produção de biossurfactante	55
2.8. Métodos analíticos	56
2.8.1 Determinação da biomassa	56
2.8.2 Determinação da tensão superficial	56
2.8.3 Determinação do Índice emulsificação (IE ₂₄)	56
2.8.4 Extração do biossurfactante	57
2.8.5 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	57
2.8.6 Teste de Fitotoxicidade	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1. Seleção dos <i>Streptomyces</i> produtores de biossurfactante	60
3.2. Seleção dos resíduos de baixo custo	61
3.3. Curva de crescimento e produção	63
3.4. Planejamento experimental	65
3.5. Toxicidade do biossurfactante	71
4. CONCLUSÃO	73
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CAPÍTULO III – PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM NOVO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR STREPTOMYCES SP. DPUA1566 ISOLADO DE LÍQUEN DA REGIÃO AMAZÔNICA	78
RESUMO	80
ABSTRACT	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAIS E MÉTODOS	83
2.1. Manutenção do micro-organismo e inóculo	83
2.2. Condições de produção do biossurfactante	84
2.3. Planejamento experimental e análise estatística	85
2.4. Determinação da tensão superficial e concentração micelar crítica	86
2.5. Determinação do Índice emulsificação (IE ₂₄)	86
2.6. Estudo da estabilidade do biossurfactante	86
2.7. Avaliação do tempo de estocagem do biossurfactante	86

2.8.	Caracterização parcial do biossurfactante	87
2.8.1.	Cromatografia em camada delgada	87
2.8.2.	Determinação de proteínas	87
2.8.3.	Determinação e extração de lipídios	87
2.8.4.	Cromatografia gasosa	88
2.8.5.	Espectrometria de Infravermelho	88
2.8.6.	Teste de dispersão e agregação de óleo	89
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1.	Planejamento fatorial	89
3.2.	Estudo da estabilidade do biossurfactante	94
3.3.	Avaliação da tensão superficial e CMC	96
3.4.	Avaliação do índice de emulsificação	97
3.5.	Caracterização química do biossurfactante	98
3.5.1.	Cromatografia em camada delgada	98
3.5.2.	Análises dos ácidos graxos	99
3.5.3.	Espectrometria no Infravermelho.	101
3.5.4.	Estudo da dispersão e agregação de óleo	102
4.	CONCLUSÃO	103
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
CAPÍTULO IV - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BIOSSURFACTANTE		
BIOELAN PRODUZIDO POR <i>Streptomyces</i> SP. DPUA1566 FRENTE A		
<i>Staphylococcus aureus</i> MULTIRRESISTENTE ISOLADOS DE MASTITE		
BUBALINA.....		
		109
	RESUMO.....	111
	ABSTRACT	112
1.	INTRODUÇÃO	113
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	114
2.1.	Micro-organismos testes e meios de manutenção.....	114
2.2.	Produção do biossurfactante Bioelan	115
2.3.	Extração do biossurfactante Bioelan	116
2.4.	Avaliação da estabilidade do <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1566 na produção do biossurfactante Bioelan.....	117
2.5	Determinação da biomassa	117

2.6.	Determinação da tensão superficial.....	117
2.7	Determinação do índice de emulsificação	118
2.8.	Atividade antimicrobiana.....	118
2.8.1.	Teste em difusão em discos e em poços	118
2.8.2.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	119
2.8.3.	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	119
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.1.	Avaliação da estabilidade do <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1566 na produção do biossurfactante Bioelan.....	120
3.2.	Atividade antimicrobiana do biossurfactante Bioelan.....	122
3.3.	Teste da CMB e CIM	123
4.	CONCLUSÃO	125
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	126
CAPÍTULO V – PATENTE: BIOSSURFACTANTE E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO		129
RESUMO.....		131
1.	Campo de aplicação	132
2.	Detalhamento do estado da técnica	133
3.	Descrição do invento.....	136
4.	Reinvidicações	138
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	140
CAPÍTULO VI – PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR ACTINOMYCETES SP. UTILIZANDO ÓLEO DE <i>Caryocar brasiliense</i> Camb. COMO FONTE DE CARBONO.....		142
RESUMO.....		144
ABSTRACT		144
1.	INTRODUÇÃO	146
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	146
2.1.	Micro-organismos.....	146
2.2.	Inóculo.....	146
2.3.	Planejamento fatorial.....	147
2.4.	Produção do biossurfactante.....	147
2.5.	Métodos analíticos	148
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	148

4. CONCLUSÃO	152
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	152
CONSIDERAÇÕES FINAIS	154
AGRADECIMENTOS	155
ANEXOS	156
Anexo 1 – Comprovante de depósito de pedido de patente.....	157
Anexo 2 - Certificado do trabalho publicado no SINAFERM	158

Capítulo I

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os avanços nos processos biotecnológicos aliados a conscientização dos consumidores e a reformulação da legislação ambiental culminaram na aprovação de moléculas de origem microbiana como uma possível alternativa em substituir as sintéticas. Nesse contexto surge a produção de surfactantes de origem biológica, os biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são moléculas anfífilas produzidas por micro-organismos e são capazes de diminuir a tensão superficial entre líquidos, pouco tóxicos, biodegradáveis e efetivos em ampla faixa de temperatura e pH (COSTA et al., 2010; NITSCHKE et al., 2006; RAHMAN et al., 2002; BANAT et al., 2000). Essas biomoléculas são aplicadas na indústria, agricultura, recuperação de petróleo, em produtos farmacêuticos e cosméticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MULLIGAN et al., 2001).

De acordo com o Jornal Brasil Econômico, o mercado mundial de surfactantes em 2010 ficou em torno dos US\$ 20 bilhões. No Brasil, a produção anual do surfactante lauril éter sulfato de sódio foi estimada em torno das 51 mil toneladas, movimentando US\$ 40 milhões (BIAGI, 2012). A Business News Americas estima que em 2015, o mercado mundial de surfactantes deverá atingir 17,8 milhões de toneladas. A Europa é o maior mercado para este produto, com 36%, seguido pelo EUA, com 32% (BUSINESS NEWS AMERICAS, 2012).

Do ponto de vista econômico, o processo produtivo dos biossurfactantes ainda não são competitivos com os sintéticos devido aos altos custos de produção (PANDEY et al., 2000). Assim, torna-se importante a busca por novos processos biotecnológicos, o uso de resíduos agroindustriais de baixo custo e o isolamento e caracterização de novos micro-organismos produtores que poderão viabilizar, no futuro próximo, a produção de biossurfactantes em escala industrial.

Dessa forma o objetivo deste trabalho foi realizar a seleção, produção, caracterização parcial e aplicação biológica frente à *Staphylococcus aureus* multirresistentes de mastites bubalina do biossurfactante por *Streptomyces* spp. isolados de líquens da Região Amazônica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são moléculas bioativas anfifílicas produzidas por micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SARAVANAKUMARI; MANI, 2010). Estas moléculas são constituídas de uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, agem na interface entre as fases fluidas com diferentes polaridades, vinculando interfaces óleo/água ou água/óleo, reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre estas fases (BANAT et al., 2000; LOBATO, 2003).

A porção hidrofóbica é composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados. A porção hidrofílica pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato, peptídios (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; BOGNOLO, 1999).

2.1.1 Classificação química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química da molécula em grupos que incluem os lipopeptídios, glicolipídios, lipídios neutros, ácidos graxos, fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (BANAT, 2000; LANG, 2002; YOUSSEF et al., 2004). As estruturas químicas destes biossurfactantes estão apresentadas na Figura 1.

Os lipopeptídios são biossurfactantes formados pela ligação de um grupo protéico a uma cadeia de ácidos graxos (MAIER, 2003). Dentre os lipopeptídios, a surfactina é a mais conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20°C) de 72 para 27 mN/m, em concentrações de até 0,005% (COOPER et al., 1981; ARIMA et al., 1968).

A surfactina, apresentada na Figura 1, é um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo constituído de 13 a 15 átomos de carbono (LANG, 2002). O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3-hidroxi-13-metil-tetradecanóico ligado por ligação lactona, tal como os demais (KOWALL et al., 1998; PEYPOUX et al., 1999).

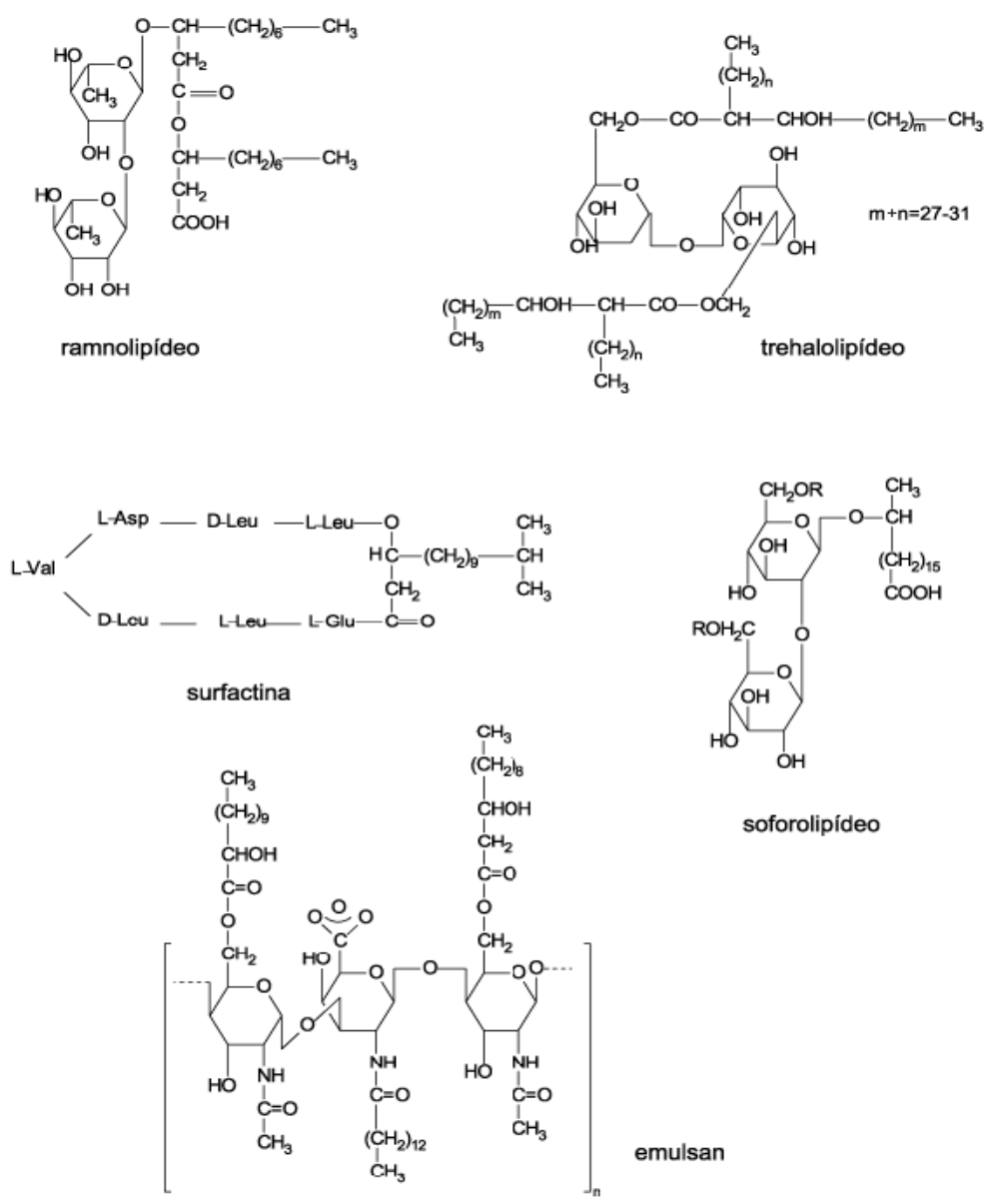


Figura 1 – Figura ilustrativa das estruturas químicas de alguns biossurfactantes (Fonte: NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Dentre os glicolipídios mais conhecidos, encontram-se os raminolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA et al., 2010). Estes biossurfactantes são formados pela ligação de uma molécula de ramnose a duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (ROSENBERG; RON, 1999).

Os sofrólipídios são biossurfactantes produzidos principalmente por leveduras *Candida bombicola* e *Torulopsis apícola*. Estes são formados através da ligação do carboidrato dímero sofrorose a uma longa cadeia de ácidos graxos e possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial da água para valores inferiores a 35 mN/m (HOMMEL et al., 1987; LANG, 2002; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

Os trealolipídios produzidos por espécies de *Nocardia* e *Corynebacterium* sp. são constituídos pelo dissacarídeo trealose ligado ao carbono C-6 e C-6' de ácidos micólicos, capazes de reduzir a tensão da água de 72 para valores menores que 26 mN/m (HOMMEL et al., 1987; DESAI; BANAT, 1997; LANG; PHILP, 1998). Essa classe de biossurfactantes está sendo utilizada como agentes terapêuticos antimicrobianos frente à bactéria patogênica como a *Escherichia coli* (ORTIZ et al., 2009).

De acordo com seu peso molecular os biossurfactantes podem ainda ser classificados em surfactantes de baixo peso molecular a exemplo dos glicolipídios (raminolipídios Rufisan e Lunasan), trealolipídios, sofrólipídios, fosfolipídios e lipopeptídios (surfactina) e de alto peso molecular que incluem os polissacarídios, proteínas, lipopolissacarídios, lipoproteínas e ou misturas complexas desses polímeros (ROSENBERG; RON, 1999; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2011; GOMES; NITSCHKE, 2012).

Os biossurfactantes também são classificados em iônicos ou não-iônicos de acordo com a polaridade da parte hidrofílica. Poucos são catiônicos, a exemplo, aqueles que contêm grupos amino (DESAI; BANAT, 1997). As estruturas e propriedades dos biossurfactantes diferem dos surfactantes sintéticos, fornecendo novas possibilidades para aplicações industriais (MERCADÉ; MANRESA, 1994).

2.1.2 Produção de biossurfactantes

A produção do biossurfactante por micro-organismos pode ocorrer de duas formas: (I) algumas bactérias e leveduras excretam emulsificantes, os quais emulsificam o substrato no próprio meio de crescimento (Figura 2) ou (II) aquelas que são capazes de modificar a estrutura da sua parede celular mantendo o bioemulsificante fixo na mesma, favorecendo o transporte dos hidrocarbonetos para dentro da célula (Figura 3). Ambos os processos podem ocorrer durante o crescimento

celular (fase exponencial) ou quando o crescimento encontra-se na fase estacionária (RON; ROSENBERG, 2002).

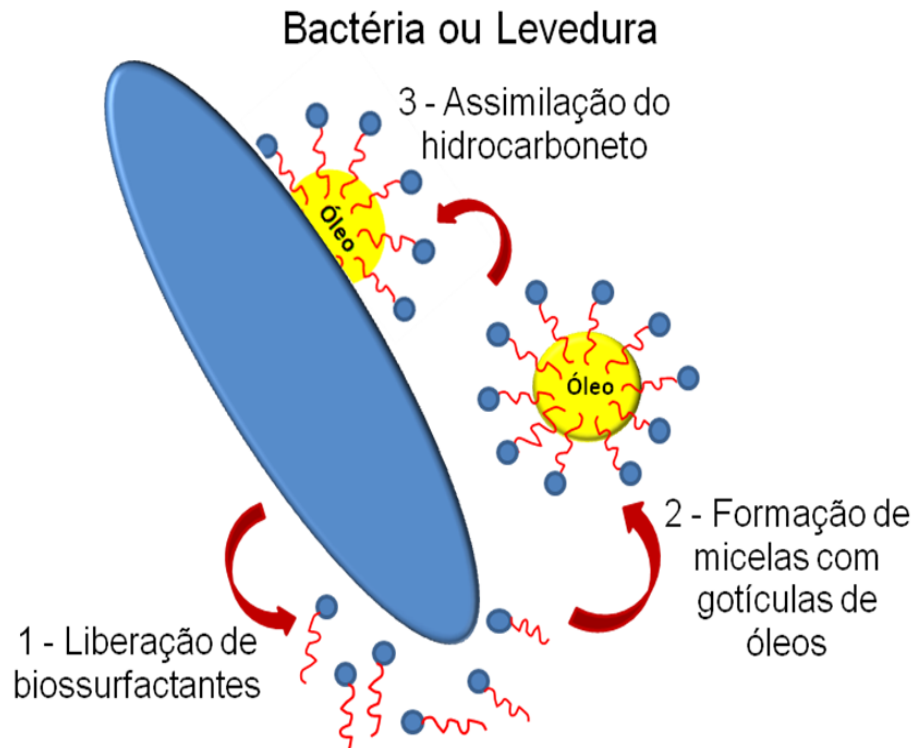


Figura 2 - Figura ilustrativa da liberação de biossurfactante, formação de micelas e assimilação de hidrocarbonetos por bactérias e leveduras (Fonte: SANTOS, 2012)

A razão pela qual os micro-organismos produzem surfactantes não é tão óbvia. Em locais onde houve derramamento de óleo, algumas bactérias produzem surfactantes extracelulares como forma de emulsionar o substrato hidrocarbônico para facilitar a sua assimilação e degradação. Entretanto, a produção de surfactantes por micro-organismos não degradadores de óleo, pode ser explicada pelo fato da célula sintetizar estes compostos como antibióticos, e assim se defender de ataques de outros micro-organismos (MORIKAWA et al., 1993). O rendimento dos biossurfactantes depende da espécie utilizada, do crescimento microbiano e do substrato utilizado na etapa de produção. A mudança de substratos utilizados na etapa de produção e as

condições de cultivo alteram a estrutura do biossurfactante e as propriedades emulsificantes (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998; BATISTA et al., 2006).

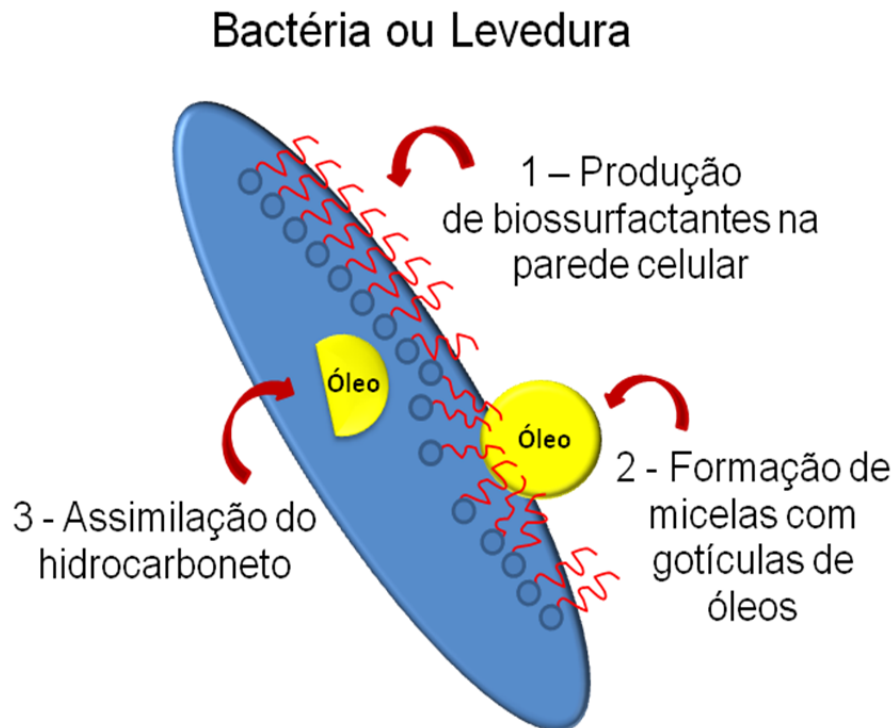


Figura 3 - Figura ilustrativa da produção de biossurfactante pela parede celular, formação de micelas e assimilação de hidrocarbonetos por bactérias e leveduras (Fonte: SANTOS, 2012)

De acordo com Van-Dyke et al. (1991), os biossurfactantes são produzidos pela célula microbiana apresentando diferentes propriedades químicas e tamanho molecular. A quantidade e propriedades dos biossurfactantes são influenciadas pela natureza do substrato carbônico, concentração de íons nitrogênio (N), fósforo (P), magnésio (Mg), ferro (Fe) e manganês (Mn) presentes no meio de cultura e condições de cultivo como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995, DESAI; BANAT, 1997).

A biodisponibilidade do substrato é um dos fatores que limita o crescimento celular e afeta a taxa de biodegradação de cadeias longas, devido à baixa solubilidade em água e a produção de biossurfactante (BARATHI; VASUDEVAN, 2001).

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes, como redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidades emulsificante e estabilizante, baixa concentração micelar crítica - CMC (concentração mínima requerida para atingir a menor tensão superficial), solubilidade e poder detergente são estudados na avaliação de sua atividade e na seleção do micro-organismo com potencial de produção (LIN, 1996; BOGNOLO, 1999; DELEU; PAQUOT, 2004).

Entretanto, surfactantes produzidos por vias biotecnológicas apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como a biodegradabilidade e a biocompatibilidade (MAIER; SOBERON-CHAVEZ, 2000). De acordo com Bognolo (1999) os biossurfactantes são mais efetivos do que os surfactantes químicos, já que reduz a tensão superficial mais rapidamente, apresentam tolerância a temperaturas de até 90°C, não precipitam em soluções salinas de até 10% (força iônica), são biodegradáveis e possuem baixa toxicidade.

De acordo com Cameotra e Makkar (1998) os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, além disso, podendo ser usado nas indústrias de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos.

2.1.3 Aplicações biológicas e terapêuticas

Os primeiros relatos envolvendo a utilização de biossurfactantes datam de 1949, quando Jarvis e Johnson reportaram as atividades antibiótica e hemolítica de um ramnolípídeo, e de 1968, quando Arima et al. (1968) descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, denominado de surfactina.

Muitos surfactantes possuem potentes atividades antibióticas e foram submetidos a diversos estudos na descoberta de novos antibióticos (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004). A surfactina é o biossurfactante mais conhecido e possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral (ARIMA et al., 1968; VOLLENBROICH et al., 1997; PEYPOUX et al., 1999; NITSCHKE et al., 2004, SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY, 2009).

A atividade antiviral da surfactina foi determinada para o vírus causador de herpes, na concentração de 80 mM e sua atividade antitumoral contra células com carcinoma de Ehrlich (VOLLENBROICH et al., 1997; NITSCHKE et al., 2004). A atividade antimicrobiana da surfactina de uma linhagem de *Bacillus subtilis* cultivada em manipueira (efluente residual produzido em grandes quantidades na preparação da farinha de mandioca) mostrou-se mais efetiva que a surfactina comercial, em ensaios com diversas espécies de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis* (NITSCHKE et al., 2004).

No mundo inteiro a utilização terapêutica de biossurfactante tem sido motivo de várias patentes. A patente JP2011001314 (JPO & INPIT, 2011) descreve um produto com composição que compreende um agente antiinflamatório e um biossurfactante aumentando a fluidez, estabilidade e alta transparência. A patente KR20090014428 (SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY, 2009) descreve uma surfactina anticâncer por inibir a proliferação celular e a proliferação das células do cólon humano (carcinoma), induzindo atividade pró-apoptóticos.

O biossurfactante produzido por *Bacillus licheniformis* TKU004 apresentou atividade antimicrobiana contra o crescimento de células de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CHEN et al., 2012). Bharali et al. (2011) estudaram o biossurfactante glicolipídico de *Alcaligenes faecalis* e obtiveram uma concentração inibitória mínima (CIM) de 16mg/L e uma concentração bactericida mínima (CBM) de 32mg/mL frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632). Gein et al. (2011) estudando o glicolipídeo de *Rhodococcus ruber* IEGM 231 verificou ausência de efeito citotóxico contra linfócitos humanos e sendo proposto como um potencial agente imunomodulador e antitumoral. Rufino et al. (2011) demonstraram a atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988 contra *Streptococcus agalactiae*, *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. oralis*.

Os biossurfactantes purificados, a partir de *Bacillus licheniformis* (lichenisina A) e *Lactococcus lactis* (xilolipídios), mostraram atividades antimicrobianas contra várias linhagens patogênicas de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina verificados pela formação de halos de inibição que variaram de 12,6 mm a 14,6 mm (SARAVANAKUMARI; MANI, 2010).

Um biossurfactante parcialmente purificado produzido por *Aspergillus ustus* apresentou amplo espectro de atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Streptococcus hemolítico*, *Micrococcus luteus*, *Eterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus epidermidis* (KIRAN et al., 2009).

De acordo com NITSCHKE (2004) o mecanismo de ação dos biossurfactantes se dá pela interação dessas moléculas com superfícies celulares, desestruturando membranas através da emulsificação de lipídios, lipoproteínas e fosfolipídios. Estudos sobre os mecanismos moleculares de permeabilização de membrana através da incorporação da surfactina demonstraram haver perda do conteúdo vesicular através da desestabilização lipídica ou formação de poros intra membranais (SHEPPARD et al., 1991; CARRILLO et al., 2003).

De acordo com Carrillo et al. (2003) peptídeos cíclicos são capazes de inativar bactérias gram-positivas e gram-negativas, através da autoformação de sistemas tubulares em membranas lipídicas.

2.1.4 Aplicações industriais dos biossurfactantes

O potencial de aplicação dos biossurfactantes está baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, desemulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades fornecem potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, bebidas, farmacêutica e cosmética (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN et al., 2001; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes podem ser usados em cosméticos e produtos de higiene. Segundo Nitschke e Pastore (2002), um produto comercial contendo 1,0 mol de soforolipídios e 12 mols de propilenoglicol apresentou compatibilidade dérmica, sendo utilizado como hidratante em cremes faciais e utilizados como umectante na produção de batons e como hidratantes para a pele e cabelos. A patente WO2009/148947 (LOUIS C. PAUL & ASSOCIATES, 2009) descreveu um dermatocosmético formulado com biossurfactante de baixa toxicidade e alta permeabilidade para a pele.

Atualmente pesquisas têm sido realizadas para uso do biossurfactante para controlar ou interromper a formação de biofilmes. Os biofilmes podem ser uma fonte de

contaminação, levando a deterioração dos alimentos e à transmissão de doenças por bactérias patogênicas (SIMÕES et al., 2010). Gomes e Nitschke (2012) usando surfactina na concentração de 0,1% verificaram a inibição do crescimento bacteriano em biofilmes pré-formados, onde as bactérias *Staphylococcus aureus* foram reduzidas em 63,7%, *Listeria monocytogenes* para 95,9% e *Streptococcus enteritidis* para 35,5%. Os ramnolipídios na concentração de 0,25% removeram 58,5% do biofilme formado por *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. enteritidis* após 2 horas de contato. Araujo et al. (2011) observaram a inibição de 100% da adesão de *L. monocytogenes* em superfície de polietileno utilizando surfactina e ramnolipídio. Estes resultados sugerem que surfactina e ramnolipídios podem ser exploradas para controlar a adesão e para interromper biofilmes de patógenos de origem alimentar. Outros campos de utilização dos biossurfactantes entre os diversos setores industriais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene e flotação de minérios
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos

Fonte: BANAT et al., 2000.

2.1.5 Utilização de resíduos industriais e agro-industriais

A produção comercial de biossurfactantes com a finalidade de substituição de surfactantes químicos para a utilização em casos de biorremediação ou outras aplicações é um objetivo a ser alcançado em longo prazo. Para tanto, devem ser desenvolvidas novas tecnologias que possibilitem a produção de biossurfactantes

(COLLA; COSTA, 2003). Na Tabela 2, estão descritos algumas fontes alternativas usadas na redução dos custos de produção de biossurfactantes. O emprego de resíduos de baixo custo tem sido alternativas exploradas para tornar os biossurfactantes competitivos (FONTES et al., 2008).

O uso de resíduos industriais como meio de cultura é uma alternativa praticável, uma vez que a matéria-prima representa 10 a 30% de custos totais em um processo biotecnológico (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Uma variedade de matérias-primas consideradas de baixo custo, inclusive soro láctico, óleos vegetais, amidos e resíduos de destilaria já foram mencionados como substâncias utilizadas na produção de biossurfactantes (MUKHERJEE et al., 2006).

Tabela 2 - Utilização de resíduos de baixo custo na produção de biossurfactantes por várias espécies de micro-organismos

Resíduos	Biossurfactantes	Espécies microbianas	Referências
Glicerol	Raminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0992	Silva et al. (2010)
Glicerol	Surfactina (Lipopeptídeo)	<i>Bacillus subtilis</i> LSFM-05	Faria et al. (2011) Vaz et al. (2012)
Óleo de soja residual de fritura e gordura	Raminolipídeo	<i>Pseudomonas</i> sp.	Costa et al. (2008)
Melaço de cana-de-açúcar	Soforolipídeo	<i>Candida bombicola</i>	Daverey; Pakshirajan, (2009)
Manipueira	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	Barros et al. (2008)
Manipueira	Raminolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Siddhartha et al. (2010)
Milhocina	Glicolipídios	<i>Candida sphaerica</i> UCP 0995	Sobrinho et al. (2008)
Resíduo de refinaria de óleo de soja	Lunasan	<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	Luna et al. (2011)
Resíduo de refinaria de óleo de soja	Rufisan	<i>Candida lipolytica</i> UCP 0988	Rufino et al. (2011)

O soro láctico da indústria de laticínios tem sido citado como um substrato barato e viável para a produção de biossurfactantes. Estudos demonstraram que resíduos de soro láctico podem constituir substratos comparativamente melhores do que os meios sintéticos para a produção de biossurfactantes em escala comercial (MUKHERJEE et al., 2006).

A manipueira é um substrato atrativo nos processos biotecnológicos e têm sido utilizadas na produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* e raminolipídios (UNICAMP, 2005; NITSCHKE; PASTORE, 2006; SIDDHARTHA et al., 2010). Vários outros substratos derivados de resíduos de amido, como efluente da indústria de processamento de arroz, águas residuais do processamento de cereais e melação são substratos em potencial para o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes (MUKHERJEE et al., 2006).

Diversos estudos com óleos derivados de plantas demonstraram que podem constituir matérias-primas eficazes e de baixo custo na produção de biossurfactantes (MUKHERJEE et al., 2006). Luna et al. (2009) avaliaram a influência do óleo de algodão (7,5%) como fonte de carbono na produção de biossurfactante por *Candida glabrata*. O biossurfactante isolado mostrou uma concentração micelar crítica (CMC) de 2,5% e uma tensão superficial de 31 mN/m. O biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP0995 utilizando milhocina (9%) e resíduo de refinaria de óleo de soja (9%) apresentou uma CMC de 0,25 mg/mL, tensão superficial do meio reduzida para 25 mN/m e um rendimento de 9 g/L (LUNA et al., 2011). O óleo de oliva foi usado como fonte de carbono na produção de um biossurfactante produzido pelo actinomicetos *Nocardiosis* sp. e foi verificado a redução da tensão superficial da água de 72 para 29 mN/m, índice de emulsificação de 80%, em 6-9 dias de cultivo (KHOPADE et al., 2012b). A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* cultivada em meio de produção constituído de borra de óleo de amendoim como fonte de carbono, produziu biossurfactante com rendimento de 5,35 mg/L (THAVASI et al., 2011).

Esses resíduos são obtidos a baixo custo das respectivas indústrias de processamento e constitui potentes substratos para a produção de biossurfactantes em escala industrial (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

2.1.6 Micro-organismos produtores

A produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos tem sido estudada por vários pesquisadores SARUBBO et al., 1999, 2001 e 2006; RUFINO et al., 2007; LUNA et al., 2009; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010; BATISTA et al., 2010; KONISHI et al., 2010; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2011; CHEN et al., 2012; JAIN et al., 2012; KHOPADE et al., 2012a; KHOPADE et al., 2012b).

Dentre as bactérias utilizadas na produção de biossurfactantes estão: *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Cronobacter sakazakii*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Nocardiopsis* sp. B4, *Streptomyces* sp. B3, *Serratia marcescens*, *Lactococcus lactis*, *Pseudozyma churashimaensis* e *Pseudomonas aeruginosa* (SARAVANAKUMARI; MANI, 2010; SILVA et al., 2010; BHARALI et al., 2011; MORITA et al., 2011; ROLDÁN-CARRILLO et al., 2011; THAVASI et al., 2011; CHEN et al., 2012; JAIN et al., 2012; KHOPADE et al., 2012a; KHOPADE et al., 2012b; KHOSHDAST et al., 2012; VAZ et al., 2012).

Várias leveduras também foram utilizadas na produção de biossurfactante como: *Calyptogena soyoae*, *Candida lipolytica*, *C. bombicola*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. sphaerica* (SARUBBO et al., 1999, 2001 e 2006; RUFINO et al., 2007; LUNA et al., 2009; BATISTA et al., 2010; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010; KONISHI et al., 2010; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2011). Os fungos filamentosos são poucos relatados na literatura como produtores de biossurfactante. Como exemplos de fungos produtores têm-se o *Trichosporon montevideense*, *Aspergillus ustus* e *Aspergillus fumigates* (CASTIGLIONI et al., 2009; KIRAN et al., 2009; MONTEIRO et al., 2011).

A produção de biossurfactante por actinomicetos tem sido pouco relatada quando comparadas aos *Bacillus* e as *Pseudomonas*. O biossurfactante glicolipídico de *Rhodococcus* sp. TA6 reduziu a tensão superficial da água para 30 mN/m (SHAVANDIA et al., 2011) enquanto que os lipídios de superfície ativa produzidos por *Nocardia* sp. B4 reduziu a tensão da água para 29 mN/m (KHOPADE et al., 2012b).

Khopade et al. (2012a) caracterizou um biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. B3 isolados de ambientes marinhos. O biossurfactante reduziu a tensão superficial da água para 29 mN/m. Richter et al. (1998) utilizando *Streptomyces*

tendai TU 901/8c produz um peptídeo hidrofóbico extracelular chamado streptofactin que diminuiu a tensão superficial da água de 72,0 para 39,4 mN/m.

Nos últimos anos, poucos biossurfactantes foram produzidos por bactérias pertencentes aos actinomicetos. No entanto, os dados sobre a produção de biossurfactante por *Streptomyces* recentes são escassos (RICHTER et al., 1998; KHOPADE et al., 2012a).

2.2 Actinomicetos

Provenientes da ordem Actinomycetales estas bactérias são gram-positivas, aeróbicas, filamentosas (Figura 4) e ocorrem sobretudo no solo (BERGEYS MANUAL, 2006).



Figura 4 – Figura ilustrativa do *Streptomyces* sp. DPUA 1566 crescido na superfície do meio de cultivo agar ISP-2 (a) e em meio líquido ISP-2 (b) (Fonte: SANTOS, 2012)

As actinobactérias são os principais micor-organismos de importância industrial devido a sua capacidade de produzir diversos metabólitos secundários como, biossurfactantes, enzimas extracelulares e antibióticos (MANAM et al., 2005; KHOPADE et al., 2012b). Entre os actinomicetos, o gênero *Streptomyces* são os maiores produtores de antibióticos e moléculas farmacologicamente ativas do que qualquer outro gênero (SAJID et al., 2011). De acordo com o Bergeys Manual (2006) essas bactérias apresentam a seguinte taxonomia: Domínio *bactéria*, Filo *actinobacteria*,

Classe *actinobacteria*, Subclasse *actinobacteridae*, Ordem *actinomycetales*, subordem *Streptomycineae*, Família *Streptomycetaceae* e Gênero *Streptomyces*.

Os *Streptomyces* produzem uma ampla variedade de novos antibióticos enquadrados em uma diversidade de classes, como: biossurfactantes, aminoglicosídeo, macrolídeo, ansamacrolídeo, beta-lactâmico, peptídeo, glicopeptídeo, antraciclina, tetraciclina, nucleosídeo, polieno e quinona (GARCIA-QUINTANA, 1997; RICHTER et al., 1998; KHOPADE et al., 2012a). Os metabólitos bioativos produzidos por *Streptomyces* spp. foram capazes de inibir o crescimento de cepas fúngicas patogênicas como *Aspergillus fumigatus* ATCC 40640, *A. niger* MTCC 1344, *A. niger* LM 05, *Trichophyton inkin* LM 067, *T. mentagrophytes* 66/01, *T. rubrum* ATCC 1683, *T. rubrum* MTCC 296, *Candida albicans* MTCC 227, *Epidermophyton floccosum* 73/01 e (OLIVEIRA et al., 2010; VALANARASU et al., 2010).

Metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* com propriedades biossurfactantes são poucos reportados. Richter et al. (1998) reportaram que o *Streptomyces tendae* TU 901/8c produz um peptídeo hidrofóbico extracelular, denominado streptofactin. Medições de atividade de superfície revelou que streptofactin diminuiu a tensão superficial da água de 72,0 para 39,4 mN/m e alcançou uma concentração micelar crítica de 36 mg/L.

Khopade et al. (2012a) produziram biossurfactante utilizando o *Streptomyces* sp. B3 isolados de ambientes marinho. A produção máxima foi observada com sacarose e extrato de levedura e o biossurfactante reduziu a tensão superficial da água para 29 mN/m, concentração micelar crítica 110 mg/L e estável em pH (6 a 12), temperatura (30 a 90°C) e concentração de sal (4 a 9%). O biossurfactante produzido pelo *Streptomyces* sp. B3 apresentou potencial atividade antimicrobiana frente a diversas bactérias patogênicas como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e contra a levedura *Candida albicans*.

2.3 Mastite

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária causada por bactérias acompanhado da redução de secreção de leite e mudança de permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue (MACHADO et al., 1998).

As mastites podem ser classificadas de acordo com a intensidade do processo inflamatório em clínica e subclínica. A mastite clínica se caracteriza por modificações visíveis no leite como a presença de pus ou grumos de fibrina e muitas vezes por alterações na glândula mamária como odor, aumento de volume e de temperatura. A mastite subclínica não apresenta sinais clínicos evidentes, podendo ser detectada por provas indiretas do leite, como por exemplo, o “Califórnia Mastitis Test” – CMT, que detecta um aumento da celularidade (BLOOD; RADOTITIS, 1989; PHILPOT; NICKERSON, 1991). Na Figura 5 Viguier et al. (2009) ilustra o processo do desenvolvimento da mastite em um úbere infectado. Os micro-organismos do ambiente infectam o úbere através da cisterna do teto. Em seguida, multiplicam-se e são atacados por neutrófilos, enquanto danificam as células epiteliais que revestem os alvéolos, com posterior liberação de enzimas como NAG-ase (N-acetil- β -D-glucosaminidase) e LDH (L-lactate dehydrogenase). Considerável dano ao tecido é observado quando as células efetoras imunes começam a combater os patógenos invasores.

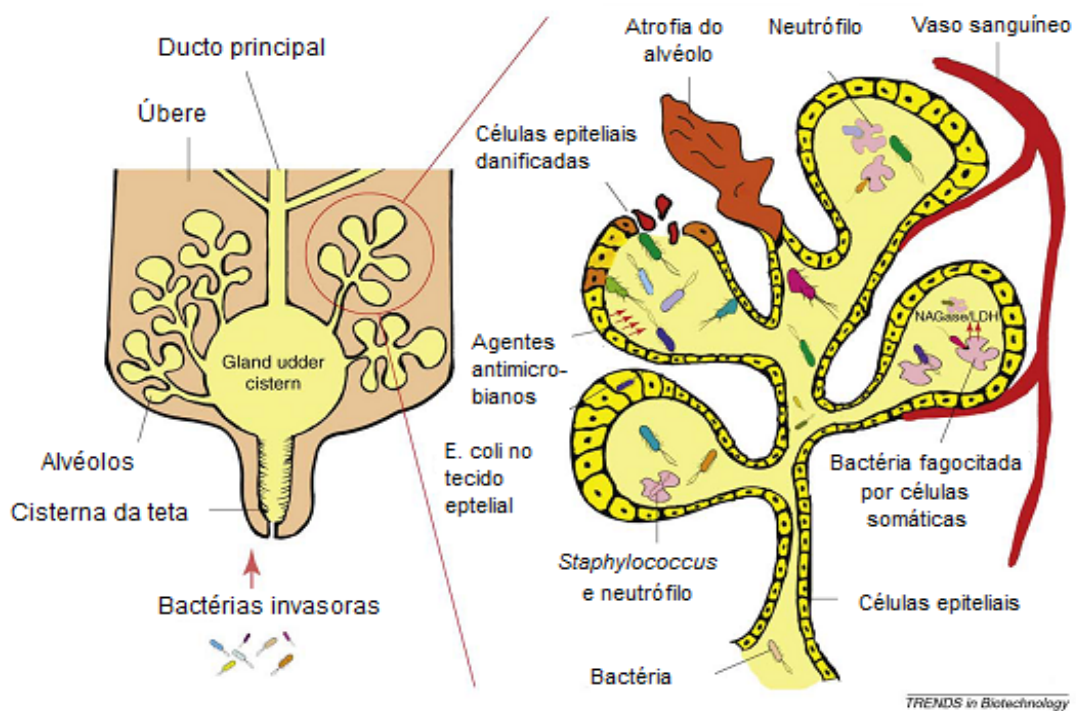


Figura 5 - Representação esquemática do desenvolvimento da mastite em um úbere infectado (Fonte: VIGUIER et al., 2009)

Esta doença é considerada a mais onerosa para a atividade leiteira por alguns autores. Estima-se que as perdas econômicas mundiais chegam a 35 bilhões de dólares por ano e nos EUA os prejuízos anuais seriam de 2 a 4 bilhões de dólares (POLITITIS et al., 1995; GIRAUDO et al., 1997).

Considerada uma doença multifatorial para a pecuária de leite, a mastite acarreta prejuízos econômicos decorrentes da diminuição da secreção láctea, ou da perda total desta capacidade, além de representar importante problema de Saúde Pública (RASOOL et al., 1985).

No Brasil, Vianni et al. (1990) afirmaram que a taxa de prevalência de mastite subclínica bubalina era de 8,81%. Pesquisadores consideraram as búfalas mais resistentes às infecções mamárias que os bovinos devido a maiores concentração de lactoperoxidase e imonoglobulinas, além de apresentarem diferenças quantitativas da celularidade do leite (SILVA; SILVA, 1994; ARAUJO; GHELLER, 2005).

O leite proveniente de fêmeas infectadas apresenta modificação em sua composição, alterando suas características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas (VIANNI, 1986). Os lactococos e em especial *Lactococcus garvieae* foram identificados como agentes etiológicos das mastites subclínica bubalinas no Estado do Rio de Janeiro (VIANNI, 2003 e 1997). Na Índia, Kumar et al. (2011) estudaram os padrões de gene de virulência de 111 espécies de *S. aureus* resistentes aos antibióticos, isolados de mastites subclínica bubalina.

Os fatores de risco para ocorrência de mastite subclínica em búfalas leiteiras em propriedades na Região Nordeste do Brasil foram relacionados às características de manejo inadequado da ordenha (MEDEIROS et al., 2011). O controle da mastite fundamenta-se em medidas higiênico-sanitárias e o uso de antibióticos (ERSKINE et al., 1993). Muhammad et al. (1997) reportaram uma taxa de cura de 78,4% (29 quartos de 37 com mastite clínica) para os quartos tratados com cefalexina por quatro dias consecutivos. Kumar e Thakur (2000) observaram que doses diárias de enrofloxacin usadas no tratamento da mastite subclínica bubalina por via intramamária (IMM) e intramuscular (IM) durante cinco dias foram efetivos em 83,33% quando administrada juntas (IMM e IM) e de 66,67% quando a administração foi apenas por via IMM.

Cunha et al. (2006) reportaram a avaliação do perfil de sensibilidade *in vitro*, com diferentes antibióticos utilizados em medicina veterinária frente às amostras bacterianas isoladas de mastite subclínica bubalina. A gentamicina foi o antibiótico que demonstrou o maior percentual de eficácia (97,98%), seguido do florfenicol (93,94%) e da enrofloxacina (90,90%), fazendo destes uma opção de tratamento sistêmico associado ao uso intramamário da gentamicina. Ainda neste trabalho, a penicilina e a tetraciclina foram às drogas que apresentaram a menor eficácia *in vitro* (65,66%) e (58,58%), respectivamente.

Mitra et al. (1995) estudando a sensibilidade *in vitro* de micro-organismos isolados de mastite bubalina verificaram que *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium* spp. foram sensíveis aos antibióticos ciprofloxacina, lincomicina, cloranfenicol, norfloxacina e ampicilina associada a cloxacilina. Saini et al. (1994) avaliaram amostras de estafilococos isolados de mastite subclínica bubalina e obtiveram excelentes resultados para antibióticos como gentamicina e cloranfenicol e resultados insatisfatórios frente à penicilina e à cloxacilina.

O *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias presentes em mastites subclínica bubalina, apresentando perfil de resistência aos antibióticos ampicilina e gentamicina (FREITAS et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009; MEDEIROS et al., 2011). Segundo MENG et al. (1998), a resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos em medicina veterinária e às aplicações subterapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças e para a promoção do crescimento e eficiência alimentar em animais de produção (MENG et al., 1998).

O progresso da indústria farmacêutica relacionado com a descoberta e a produção de novos agentes antimicrobianos não está sendo eficaz na contenção da mutagênese de resistência a drogas desenvolvida pelos micro-organismos. Enquanto os mecanismos de resistência desenvolvidos por micróbios estão mais eficazes e as drogas conhecidas mostram-se cada vez menos eficientes no combate às patologias (PRATES; BLOCH JÚNIOR, 2000).

As ameaças à saúde causadas por infecções de micro-organismos resistentes a antibióticos e a agentes germicidas apresentam índices jamais registrados. Muitos micro-organismos desenvolveram resistência tanto contra os antibióticos de uso

convencional (ampicilina, gentamicina) quanto contra os antibióticos de última geração (amoxicilina), provocando graves problemas de saúde pública e na medicina veterinária (AUSTIN et al., 1999; FREITAS et al., 2005; MEDEIROS et al., 2009; MEDEIROS et al., 2010).

Na última década foi reportado o elevado número de bactérias resistentes a mais de um antibiótico através de vários mecanismos de resistência como mutações ou transferências horizontais de genes, que codificam bombas de efluxo, enzimas degradativas e modificadoras, e proteínas de proteção ribossomal (STOVER, 2000; AMINOV et al., 2001; KHACHATRYAN et al., 2004; PIDDOCK, 2006).

A hipótese aceita sugere que bactérias gram-negativas podem resistir ao efeito letal de muitos antimicrobianos pela eliminação dos agentes químicos para fora das células bacterianas mais rápido do que seu acúmulo no interior destas (NIKAIDO, 1998).

Ainda não foi esclarecido o procedimento da evolução do mecanismo de eliminação dos agentes químicos para fora das células bacterianas. Especula-se que elas teriam surgido da necessidade dos micro-organismos em eliminar toxinas naturalmente presentes no seu ambiente (GREENBERG, 2000).

Sabendo disso, torna-se cada vez mais importante a investigação e a descoberta de drogas capazes de atuarem diretamente sobre a parede e a membrana plasmática, provocando lise e morte celular, ao primeiro contato. Os mais sofisticados mecanismos de defesa desenvolvidos pelos micro-organismos ainda não são suficientes para neutralizar uma ação do tipo detergente (PRATES; BLOCH JÚNIOR, 2000).

Um trabalho sistemático de prospeção dos biosurfactantes, com identificação e produção em larga escala, possibilitará um avanço na produção de novas drogas antimicrobianas e um melhor conhecimento dos diversos micro-organismos produtores. Portanto, os problemas de perdas econômicas provocados pela mastite subclínica bubalina, a resistência de bactérias a antibióticos usados no controle da mastite, os impactos ambientais causados por resíduos agroindustriais e os custos de produção incluem os biosurfactantes como uma alternativa promissora no desenvolvimento de uma nova droga com ação antimicrobiana frente a diversos patógenos multirresistentes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar, produzir e determinar as características físico-químicas parcial e aplicação biológica do biossurfactante por *Streptomyces* spp. isolados de líquens da Região Amazônica frente a estipes de *Staphylococcus aureus* multiresistentes de mastites subclínica em *Bubalus bubalis*.

3.2 Objetivos Específicos

- Selecionar dentre espécies de *Streptomyces* isolados de líquens da Região Amazônica, os melhores produtores de biossurfactante;
- Selecionar a melhor fonte de carbono e de nitrogênio utilizando resíduos industriais e agroindustriais de baixo custo na produção do biossurfactante pelos isolados de *Streptomyces* spp. selecionados;
- Determinar a curva de crescimento e de produção do biossurfactante a partir do *Streptomyces* e dos melhores resíduos selecionados;
- Avaliar em frascos agitados as melhores condições de produção através de planejamentos estatísticos;
- Realizar o isolamento, caracterização físico-química parcial e biológica do biossurfactante;
- Determinar o tempo de estocagem do biossurfactante isolado;
- Avaliar a estabilidade do *Streptomyces* selecionado na produção de biossurfactante em frascos agitados em função do tempo de cultivo;
- Avaliar a toxicidade do biossurfactante frente à *Artemia salina* e a fitotoxicidade frente às sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.);
- Avaliar a atividade antimicrobiana do biossurfactante frente as bactérias multiresistentes isoladas de mastite subclínica em *Bubalus bubalis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMINOV, R. I.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R. I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation o primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribossomal protection proteins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 22-32, 2001.
- ARAUJO, L. V. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, p. 481-488. 2011.
- ARAUJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 77-83. 2005.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.10, n. 3, p. 488-494. 1968.
- AUSTIN, D. J.; KRISTINSSON, K. G.; ANDERSON, R. M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. **Proceedings National Academy Sciences**, v. 96, p.1152-1156. 1999.
- BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal - state of the art (review). **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 15, n. 3, p. 251-267. 1995.
- BANAT, I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, v. 198, p. 44-47. 2000.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Potencial commercial aplicação de surfactantes microbianos. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508. 2000.
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolada de um solo contaminado com petróleo. **Environmental International**, v. 26, p. 413-416. 2001.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985. 2008.
- BATISTA, R. M. et al. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. **Water Environment Research**, v. 82, n. 5, p. 418-25. 2010.
- BATISTA, S. B. et al. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 868-875. 2006.
- BERGEY, MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Available from: <http://www.bergeys.org>. 2006. **The Prokaryotes** - A Handbook on the Biology of Bacteria Third Edition Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 2006. p. 605-622.

BHARALI, P. et al. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 682-690. 2011.

BIAGI, PAULO DE. Química da beleza seduz a Rhodia. **Revista de Cosmetologia**. Capturado em 04 de janeiro de 2012 em: http://www.revistadecosmetologia.com/detalhes_noticias.php?id=454

BLOOD, D. C.; RADOTITIS, O. M. **Veterinary medicine**: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Londres: Bailliere Tindall, 1989. 1502p.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as Emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and science. A - Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52. 1999.

BUSINESS NEWS AMERICAS. Mercado mundial de surfactantes debiera llegar a US\$16.650 el 2012. Capturado em 03 de janeiro de 2012 em: http://www.bnamericas.com/news/petroquimicos/Mercado_mundial_de_surfactantes_de_biera_llegar_a_US*16,650mn_el_2012

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

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

CARRILLO, C. et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 611, n. 1-2, p. 91-97. 2003.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292-295. 2009.

CHEN, Y-C. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 62-69. 2012.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, p. 85-103. 2003.

COOPER, D. G. et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408 – 412. 1981.

COSTA, S. G.V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensioativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34-38. 2008.

CUNHA, A. P. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 17-21, 2006.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 246-2531. 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 499-504. 2009.

DELEU, J. D.; PAQUOT, M. From renewable vegetais resources to microorganisms: new trends in surfactnats. **Computers Rendus Chimie**, v. 7, p. 641-646. 2004.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Review**, v. 61, p. 47-64. 1997.

ERSKINE, R. J. et al. Advances in the therapy for mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, p. 499-513, 1993.

FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951-1957. 2011.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099. 2008.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p.171-177. 2005.

GARCIA-QUITANA. H.; ZAROR C. L.; LEIVA P. S. Efecto antibiótico de cepas silvestres de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. **Revista Medica do Chile**, v. 125, p. 1157-1164. 1997.

GEIN, S. V. et al. In vitro cytokine stimulation assay for glycolipid biosurfactant from *Rhodococcus ruber*: role of monocyte adhesion. **Cytotechnology**, v. 63, n. 6, p. 559-566. 2011.

GIRAUDO, J. A. et al. Field trials of vaccine against bovine mastitis - Evaluation in heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 845-853. 1997.

GOMES, M, Z, V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 441-447. 2012.

GREENBERG, P. E. Bacterial genomics: Pump up the versatility. **Nature**, v. 406, p. 947-948. 2000.

HOMMEL, K. et al. Production of watersolublesurface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 199-205. 1987.

JAIN, R. M. et al. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2320-2326. 2012.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A. Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 4124-4126. 1949.

JPO & INPIT (Tokio, JP) Shuhei Yanagiya Yamamoto, Nishiya Yoshiaki Shusaku. **Composition containing biosurfactant and antiinflammatory agent**, JP2009/0146619. PI. JP2011/001314. 19 de junho de 2009, 06 de janeiro de 2011.

KHACHATRYAN, A. R. et al. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. **Applied Environment Microbiology**, v. 70, p. 752-757. 2004.

KHOSHDAST, H. et al. Frothability and surface behavior of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MA0. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, n. 15, p. 127-134. 2012.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311-318. 2012a.

KHOPADE, A. et al. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4 **Desalination**, v. 285, p. 198-204. 2012b.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256. 2009.

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

KONISHI, M. et al. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyoae* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 169-175. 2010.

KOWALL, M. et al. Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 204, n. 1, p.1-8. 1998.

KUMAR, R. et al. Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, p. 31-38. 2011.

KUMAR, P.; THAKUR, D. K. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of mastitis in buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, v. 77, p. 145-6, 2000.

LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion I Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12-20. 2002.

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

LIN, S. Particle-bound PAH in ambient air. **Journal of Chemical Techonology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120. 1996.

LOBATO, A. K. C. **Estudo da produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de poços de petróleo**. 2003. 148 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN. 2003.

LOUIS C. PAUL & ASSOCIATES (New York, US) Donald Owen; Lili Fan. **Oligomeric biosurfactants in Dermatocosmetci Compositions**. US-2009/045616. PI. WO 2009/148947 A1. 28 de maio de 2008, 10 de dezembro de 2009.

LUNA, J. M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP0995. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1527-1534. 2011.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: Characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793. 2009.

MACHADO, P. F.; BARANCELLI, G.; PEREIRA, A. R. CCS: Leite com mais qualidade e melhor rendimento industrial. **Indústria de Laticínios**, v. 2, p. 65-68. 1998.

MAIER, R. M. Biosurfactant: evolution and diversity in bacteria. **Adv. Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-121. 2003.

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p. 625-633. 2000.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 371-376. 1998.

MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434. 2002.

MANAM, R. R. et al. Lajollamycin, a nitro-tetraenespiro-beta-lactone-gamma-lactum antibiotic from the marine actinomycetes *Streptomyces nodosus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 240-3. 2005.

MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 569-574. 2009.

MEDEIROS; E. S. et al. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6. 2011.

MENG, J. et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 11, p. 1511-1514. 1998.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agroindustrial byproducts for biosurfactant production. **Journal of American Oils and Chemical Society**, v. 71, p. 61-64. 1994.

MITRA, M. et al. Prevalence of subclinical mastitis in na organised buffalo farm at Haringhata. **Indian Veterinary Journal**, v. 72, p. 1310-1319. 1995.

- MONTEIRO, A. S. et al. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 467-476. 2011.
- MORIKAWA, M. et al. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp.* strain M1538. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 20, p. 6459-6466. 1993.
- MORITA, T. et al. Isolation of *Pseudozyma churashimaensis* sp. nov., a novel *Ustilaginomycetous* yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 137-144. 2011.
- MUHAMMAD, G. et al. Evaluation of cephalixin in the treatment of clinical mastitis in buffalo. **Indian Journal of Dairy Science.**, v. 50, p. 205-8. 1997.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN. R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trens in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515. 2006.
- MULLIGAN, C.; YONG, N. R.; GIBBS, F. B. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engeneering Geology**, v. 60, p. 371-380. 2001.
- NIKAIDO, H., Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. S32-S41. 1998.
- NITSCHKE, M. **Produção e caracterização de biosurfatantes de B. subtilis utilizando manipueira como substrato**. 2004. 211 f. Doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil. 2004.
- NITSCHKE, M. et al. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591-596. 2004.
- NITSCHKE, M. et al. Oil waste as substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562-1566. 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p.772-776. 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341. 2006.
- OLIVEIRA, T. L. et al. Antifungal activity and kinetics of microbial death of extracts obtained from *Streptomyces* spp. isolated from paraibano soils. **Revista Brasileira de Farmacognozia**, v. 20, n. 1, p. 20-27. 2010.
- ORTIZ, A. et al. Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 158, p. 46-53, 2009.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153-62. 2000.
- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553-563. 1999.

- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: counter attack**. Naperville: Babson Bros., 1991. 150p.
- PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps-not just resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 629-635. 2006.
- POLITITIS, I. et al. Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 179-184. 1995.
- PRATES, M. V.; BLOCH JÚNIOR, C. Peptídeos Antimicrobianos - uma alternativa no combate a microrganismos. **Biociência**, n. 17, p. 30-36. 2000.
- RAHMAN, K. S. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 18, p. 1277-1281. 2002.
- RASOOL, G. et al. Incidence of subclinical mastitis in Nili-Ravi buffalos and salriwal cows. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 5, p. 76-78. 1985.
- RICHTER, M. et al. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 165-171. 1998.
- ROLDÁN-CARRILLO, T. et al. Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 384-389. 2011.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229-236. 2002.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. **Surface active polymers from the genus Acinetobacter**. In: Kaplan DL (ed). Biopolymers from renewable resources. Springer, Berlin Heidelberg, New York. 1999. p. 281-291.
- RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5. 2011.
- RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 734-741. 2007.
- SAJID; I.; SHAABAN, K. A.; HASNAIN, S. Identification, isolation and optimization of antifungal metabolites from the *Streptomyces malachitofuscus* ctf9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2. p. 45-51. 2011.
- SARAVANAKUMARI, P.; MANI, K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 8851-8854. 2010.
- SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 423-426. 1999.

- 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. 2006.
- SARUBBO, L. A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59–67. 2001.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current emergent biofilm control strategies. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583. 2010.
- SHEPPARD, J. D. et al. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1064, p.13-23. 1991.
- SIDDHARTHA, G. V. et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511-1516. 2010.
- SHAVANDIA, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 477-482. 2011.
- SILVA, I. D; SILVA, K. F. S. T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo Journal**, v. 10, n. 2, p. 133-137. 1994.
- SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183. 2010.
- SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917. 2008.
- STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, p. 947-948. 2000.
- SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY (Hon Kong, KR) Hong Sung Youl Kwon Moo Sik Lee Choong Eun Cho Jae Youl Kim Seo Young. **Anti-cancer composition comprising surfactin**. KR2007/0077882. PI. KR2009/0014428. 02 de agosto de 2007, 11 de fevereiro de 2009.
- THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3366-3372. 2011.
- UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas (São Paulo, BR). Glaucia Maria Pastore; Cristine Fior Clemente Santos; Marcia Nitschke. **Processo de produção de biosurfatante por *Bacillus subtilis*, utilizando resíduo da indústria de mandioca**. BR20030003853. PI BR-0303853 (A), 18 de setembro de 2003, 28 de junho de 2005.
- VALANARASU, M. et al. Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, p. 290-297. 2010.

- VAN-DYKE, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 241-246. 1991.
- VAZ, D. A. et al. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 167-174, 2012.
- VIANNI, M. C. E. **Etiologia das mastites subclínicas bubalinas e sua influência sobre as características do leite**. 1997. 162p. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.
- VIANNI, M. C. E. **Influência de agentes etiológicos da mastite subclínica bovina sobre as características físico-químicas do leite**. 1986. 113 f. Tese de Mestrado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- VIANNI, M. C. E.; LÁZARO, N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 47-51. 2003.
- VIANNI, M. C. E. et al. Eficiência do Califórnia Mastitis Test (CMT) na estimativa no número de células somáticas do leite bubalino. **Ciência Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 3-4. 1990.
- VIGUIER, C. et al. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-49. 2009.
- VOLLENBROICH, D. et al. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, n. 25, p. 289-297. 1997.
- YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347. 2004.

Capítulo 2

SELEÇÃO DE *STREPTOMYCES* SPP. ISOLADOS DE LIQUENS DA
AMAZÔNIA PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO
COMO SUBSTRATOS RESÍDUOS INDUSTRIAIS E AGRO-INDUSTRIAIS

SELEÇÃO DE *STREPTOMYCES* SPP. ISOLADOS DE LIQUENS DA AMAZÔNIA PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO COMO SUBSTRATOS RESÍDUOS INDUSTRIAIS E AGRO-INDUSTRIAIS

SCREENING FOR BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *STREPTOMYCES* SPP. ISOLATED FROM THE AMAZON REGION USING INDUSTRIAL AND AGRO-INDUSTRIAL WASTES.

Eduardo Francisco dos Santos¹, Leonie Asfora Sarubbo² e Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife-Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a produção de biossurfactante por quarenta e um *Streptomyces* spp. isolados de líquens da região Amazônica. Os micro-organismos foram cultivados em diferentes substratos industriais e agroindustriais de baixo custo como: glicerol, milhocina, óleo de soja residual de frituras, óleo de motor residual e óleo de *Caryocar brasiliense*. A produção de biossurfactante foi verificada pela redução da tensão superficial (TS) e pelo índice de emulsificação (IE) do biossurfactante. Dos 41 isolados de *Streptomyces* spp. 24,39% (dez) foram selecionadas por reduziram a tensão superficial dos meios para valores inferiores a 29,63 mN/m, após 144 horas de cultivo. Dentre os dez isolados a melhor produtora de biossurfactante foi o *Streptomyces* sp. DPUA1566 que reduziu a tensão superficial do meio 52,01 para 24,14 mN/m, com rendimento de 1,76 g/L após 144 horas de cultivo na presença de 2% de milhocina e 1% de óleo de soja residual de frituras. As melhores condições de cultivo para a produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foram temperatura de 28°C, pH 7,0, agitação de 150 rpm e relação do volume do meio e do volume do Erlenmeyer de 90%. O biossurfactante apresentou ausência de toxicidade frente à *Artemia salina*, *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleracea* L. Estes resultados sugerem que *Streptomyces* spp. da coleção DPUA isolados de líquens da Região Amazônica são candidatos potenciais para a produção de biossurfactante. O *Streptomyces* sp. DPUA1566, cultivada em resíduos agro-industriais de baixo custo representa uma alternativa de produção de um biossurfactante, com potencial para aplicações nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e de alimentos.

.Palavras-chave: Biossurfactante, *Streptomyces*, Milhocina, Tensão superficial e Óleo de frituras.

ABSTRACTS

This study evaluated the ability to produce biosurfactant using industrial and agro-industrial substrate by *Streptomyces* spp. isolated from lichens in the Amazon region. The micro-organisms were grown on different agro industrial substrates low cost as glycerol, corn steep liquor, soybean waste frying oil, waste motor oil and *Caryocar brasiliense*. The biosurfactant production was followed by measuring the surface tension (ST) and emulsification index (EI₂₄). Of the 41 isolates of *Streptomyces* spp. 24.39% (ten) were selected by the reduced medium surface tension to less than 29.63 mN /m after 144 hours of cultivation. Among the ten isolates the best producer biosurfactant was the *Streptomyces* sp. DPUA1566 which reduced medium surface tension from 52.01 to 24.14 mN / m, with a yield of 1.76 g/L of biosurfactant after 144 hours in medium containing 2% corn steep liquor and 1% soybean oil residual frying . The best conditions cultivation for the of biosurfactante production by *Streptomyces* sp. DPUA1566 were 28 ° C, pH 7.0, agitation 150 rpm and relationship between volume medium volume and Erlernmeyer volume 90%. The biosurfactant did not show toxicity against *Artemia salina*, *Lactuca sativa* L. and *Brassica oleracea* L. These results suggest that *Streptomyces* spp. DPUA isolated from lichens from Amazon region are appropriate candidates to biosurfactant production. The new strain of *Streptomyces* sp. DPUA1566 grown in agro-industrial waste is considered a low cost alternative to biosurfactant production, with potential applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industries.

Key Words: Biosurfactant, *Streptomyces*, Cornsteep liquor, Waste frying oil, *Caryocar brasiliense*

1 INTRODUÇÃO

Os actinomicetes pertencem a ordem *Actinomycetales* e são bactérias, gram-positivas, aeróbicas, filamentosas e encontradas, sobretudo no solo (BERGEYS MANUAL, 2006). Várias espécies da família *Streptomycetaceae* produzem uma gama de metabólitos biológicos ativos, tais como biossurfactantes, antibióticos e enzimas extracelulares (INBAR et al., 2005; MANAM et al., 2005; KHOPADE et al., 2012a). Os actinomicetes *Nocardiosis* sp. B4, *N. lucentensis* MSA04, *N. alba* e *Gordonia* sp. BS29 isolados de ambientes marinhos foram usados na produção de biossurfactantes (FRANZETTI et al., 2009; GANDHIMATHI et al., 2009; KIRAN et al., 2009; KIRAN et al., 2010; KHOPADE et al. 2012b).

Os *Streptomyces* foram poucos relatados como produtores de biossurfactantes. Khopade et al. (2012a) caracterizou um biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. B3 isolados de ambientes marinhos. O biossurfactante reduziu a tensão superficial da água para 29 mN/m. Richter et al. (1998) utilizando *Streptomyces tendai* TU 901/8c produz um peptídeo hidrofóbico extracelular chamado streptofactin que diminuiu a tensão superficial da água de 72,0 para 39,4 mN/m.

Os biossurfactantes são moléculas bioativas anfifílicas produzidas por micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. De acordo com a composição química da molécula são classificados em grupos que incluem os lipopeptídios, glicolipídios, lipídios neutros, ácidos graxos, fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; BANAT, 1997; BANAT, 2000; LANG, 2002; YOUSSEF et al., 2004).

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes, como redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidades emulsificante e estabilizante, baixa concentração micelar crítica - CMC (concentração mínima requerida para atingir a menor tensão superficial), solubilidade e poder detergente são utilizadas na avaliação de sua atividade e na seleção do micro-organismo com potencial de produção (BOGNOLO, 1999; DELEU; PAQUOT, 2004).

A atenção dada aos biossurfactantes esta em função de suas vantagens que incluem baixa toxicidade, são biodegradáveis, apresentam compatibilidade ambiental,

capacidade de formação de espuma, alta seletividade e estabilidade em ambientes extremos (DESAI; BANAT, 1997). Diversos resíduos agro-indústrias são utilizados na produção de biossurfactantes como glicerol, melão, óleos residuais de fritura, milhocina - resíduo industrial do processamento de milho e a manipueira (NITSCHKE; PASTORE, 2006; COSTA et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009; SILVA et al., 2010; FARIA et al., 2011; VAZ et al., 2012). Estima-se que a utilização de resíduos pode reduzir em até 30% o custo total de produção na maioria dos processos biotecnológicos (CAMEOTA; MAKKAR, 2004).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar a capacidade de produção biossurfactantes por *Streptomyces* spp. isoladas de líquens na Região Amazônica, utilizando como substratos resíduos industriais e agro-industriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todos os produtos químicos e solventes utilizados no estudo foram de grau analítico e fornecido pela Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

2.2 Micro-organismos

Foram utilizados 41 *Streptomyces* spp. isolados de líquens da Região Amazônica, pertencentes à Coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA) foram cedidas pela Profa. Maria Francisca Simas Teixeira.

2.3. Meios de manutenção e preparação do inóculo

Os 41 *Streptomyces* spp. da coleção DPUA foram mantidos em meio Agar ISP-2 (PRIDHAM et al, 1957), modificado pela retirada da glicose (extrato de levedura 0,4% v/v, extrato de malte de 1% v/v; Agar 2% v/v), incubados em estufa bacteriológica a temperatura de 30°C, durante 15 dias e mantidas em temperatura de 28°C. As

amostras foram repicadas a cada 30 dias. Todos os 41 isolados testados foram conservados como cultura estoque em criotubos utilizando glicerol 10% (v/v) e mantidos em freezer a -18°C.

O inóculo para produção dos biossurfactantes foram preparados utilizando frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio líquido ISP-2 (extrato de levedura 0,4% v/v, extrato de malte 1% v/v, pH 7,0) e adicionados fragmentos de 6mm de diâmetro, retirados da área central das culturas dos *Streptomyces*, crescidos em meio Agar ISP-2, a 30°C, durante 15 dias. Os Erlenmeyers foram incubados em agitador orbital (B. BRAUN) a 150 rpm, 28°C por 48 horas. Alíquotas do fermentado (5 mL) foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL do meio líquido ISP-2 e agitados em vórtex durante 10 segundos para atingir a concentração de 10^8 UFC/mL, o que correspondeu a uma solução padrão de McFarland a 0,5, ou seja, um valor de absorbância igual a 0,1 a 600nm. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C/1 atm de pressão, durante 20 minutos.

2.4. Seleção dos *Streptomyces* produtores de biossurfactantes

Para selecionar dentre os 41 isolados de *Streptomyces* spp. da coleção DPUA os melhores produtores de biossurfactante foram utilizados inicialmente dois meios de cultivo, descritos a seguir.

O meio de cultivo (A): constituído de (g/L): peptona (10,0), K_2HPO_4 (4,75), NH_4Cl (1,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,6), 10 mL de solução mineral (100 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $CaCl_2 \cdot H_2O$, 100 mg de $MnCl_2$ e água destilada q.s.p. 100 mL) e glicerol 1% (g/v).

O meio de cultivo (B): constituído de (g/L): peptona (8,0), extrato de levedura (2,0), K_2HPO_4 (4,75), NH_4Cl (1,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,6), 10 mL de solução mineral (100 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $CaCl_2 \cdot H_2O$ e 100 mg de $MnCl_2$, água destilada q.s.p. 100 mL) e óleo de *Caryocar brasiliense* 1% (v/v). Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C/1 atm de pressão, durante 20 min.

Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 ml de cada meio de produção, acrescido de 2% (v/v) da suspensão do inóculo de cada *Streptomyces* spp. da coleção DPUA. As culturas foram incubadas em agitador orbital a

200 rpm, 28°C, durante 144 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 Seleção de resíduo de baixo custo para produção dos biossurfactantes

Para selecionar os melhores resíduos, os isolados de *Streptomyces* spp. da coleção DPUA selecionados como descritos no item 2.4 foram submetidos a cultivos em quatro diferentes meios de cultivo para produção utilizando resíduos considerados de baixo custo com suas composições apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Meios de cultivo para produção de biossurfactantes e suas composições a partir de resíduos industrial e agro-industriais

Meio	Composição
I	Milhocina (2g/L) + sais* + solução mineral** + óleo de soja (1g/L)
II	Milhocina (2g/L) + óleo de soja residual de frituras (1g/L)
III	Peptona (2g/L) + sais* + solução mineral** + óleo de motor residual (1g/L)
IV	Peptona (2g/L) + sais* + solução mineral** + óleo de soja residual de frituras (1g/L)

(*) e (**) como descrito no item 2.4

O óleo de soja residual de frituras (coletado de um estabelecimento comercial), óleo de soja (comercial) e óleo de motor residual (obtidos de oficina de automóvel bicomustível) foram testados como fontes de carbono. As fontes de nitrogênio avaliadas foram peptona e milhocina (resíduo industrial do processamento de milho a partir da fábrica da Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, Brasil. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL do meio de cultivo. O pH dos meios de cultivo foram ajustados para 7,0 e esterilizados em autoclave a 121°C, durante 20 min. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 200 rpm, 28°C, durante 144 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6 Curva de crescimento e produção de biossurfactante

A curva de crescimento e produção do biossurfactante pelo isolado de *Streptomyces* sp. da coleção DPUA selecionado foram acompanhadas através da determinação da biomassa, pH, tensão superficial, índice de emulsificação e rendimento do produto. O cultivo foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL do meio selecionado (como descrito no item 2.5) e 2% do inóculo a 10^8 UFC/mL. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,0 e esterilizados em autoclave a 121°C, durante 20 min. Os frascos foram incubados a 28°C em agitador orbital a 200 rpm, durante 144 h, para posterior análise estatística.

2.7 Planejamento experimental e análise estatística

O isolado de *Streptomyces* sp. da coleção DPUA e os resíduos selecionados foram utilizados para a avaliação das melhores condições de produção do biossurfactante com auxílio de um planejamento fatorial. Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para verificar os efeitos e interações das variáveis pH, agitação, razão entre o volume do meio e volume do Erlenmeyer (RVME) e a temperatura sobre as variáveis respostas tensão superficial e índice de emulsificação. O ponto central foi executado em quatro repetições para permitir a estimativa do erro experimental (NETO et al., 2002). Os valores das variáveis e níveis estão apresentados na Tabela 2. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados com o programa Statística 6,1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Tabela 2 - Valores e níveis das variáveis independentes utilizados no planejamento fatorial para produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. da coleção DPUA selecionado

Variáveis independentes	-1	Ponto central	+1
pH	5.5	7.0	8.5
RVME (%)	60	70	80
Agitação (rpm)	100	150	200
Temperatura (°C)	28	30	32

2.8 Métodos analíticos

Todas as análises foram feitas com o líquido metabólico livre de células obtido por centrifugação das culturas a 10.000 x g por 20 min. e filtração a vácuo. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.8.1 Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi realizada por gravimetria utilizando 10 mL do líquido metabólico após o período de fermentação e centrifugados a 10.000 x g durante 20 min. O *pellet* celular foi seco em estufa a 105°C por 24 horas, mantidos em desecador até peso constante.

2.8.2 Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial dos biossurfactantes brutos produzidos por cada amostra de *Streptomyces* spp. da coleção DPUA presente no líquido metabólico livre de células foi realizada utilizando tensiômetro Sigma 700 (KSV Instruments Ltd., Finlândia) pelo método do anel Du Nouy à temperatura ambiente. O tensiômetro foi calibrado medindo-se a tensão superficial da água Milli-q (72 mN/m) (COOPER et al., 1981).

2.8.3 Determinação do Índice emulsificação (IE₂₄)

O índice de emulsificação (IE₂₄) do líquido metabólico livre de células foi determinado utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg et al. (1987). O líquido metabólico livre de células foi misturado em tubos de ensaio a compostos hidrofóbicos na proporção de 1:1 e homogeneizados em Vórtex, durante dois minutos. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura de 28°C, durante 24 horas. Em seguida foram efetuadas medidas da altura da Camada Emulsificada (CE) e da Altura Total (AT) dos componentes no tubo de ensaio. O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: $IE_{24} = (CE/AT) \times 100$. Os compostos utilizados no teste descrito acima foram os seguintes hidrocarbonetos: n-hexadecano, óleo de motor, óleo de motor residual e o óleo vegetal de soja (*Glycine Max* L.).

2.8.4 Extração de biossurfactante

Para isolamento do biossurfactante, o pH do líquido metabólico livre de células foi ajustado para 2,0 com uma solução de HCl a 6M. Em seguida, iguais volumes de clorofórmio/metanol (2:1) e do líquido metabólico livre de células foram adicionados em funil de separação de 500 mL, sendo a mistura agitada de forma vigorosa por 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases (JAVAHERI et al., 1985). A fase orgânica foi removida e a operação repetida por mais duas vezes.

O produto obtido foi concentrado por centrifugação a 3.000 x g por 5 minutos. O *pellet* formado foi removido, suspenso em água Milli-q e ajustado o pH para 7,0 com uma solução 1M de NaOH. A suspensão foi colocada em placas de Petri esterilizada, evaporada a 37°C em estufa de secagem durante 12 horas. Em seguida colocada em dessecador e pesada até peso constante para se determinar o rendimento em biossurfactante isolado (g/L).

2.9 Toxicidade frente à *Artemia salina*

A avaliação da toxicidade frente à *A. salina* foi realizada segundo metodologia descrita por Meyer et al. (1982). Uma solução de sal marinho em água destilada (30 g/L) foram preparados para incubação dos ovos de *A. salina* (10 mg), que foram expostos à luz artificial (lâmpada incandescente de 60 watts) durante 24 horas para eclosão das larvas.

Para efetuar o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez amostras de larvas em tubos contendo 5 mL de solução salina (pH 8 e 28°C) e o biossurfactante isolado nas concentrações de 1, 10 e 100 mg/mL. Um grupo controle foi preparado nas mesmas condições sem a presença do biossurfactante. Os tubos foram mantidos sob luz artificial a temperatura 28°C por um período de 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes do grupo controle e dos grupos expostos às frações. A concentração limiar de toxicidade, expressa como concentração de biossurfactante por 100 ml de água salina, foi definida como a menor concentração que foi letal aos microcrustáceo testado no prazo de 24 h. Os testes foram realizados em triplicatas.

2.10 Teste de Fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Tiquia et al. (1996). As sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.) foram desinfetadas com água destilada e hipoclorito de sódio (2%). Em placas de Petri previamente esterilizadas contendo papel de filtro (J. LABOR) foram colocadas de forma equidistantes 10 sementes e 5,0 mL da solução do biossurfactante isolado nas concentrações de 1, 10 e 100 mg/mL. As placas foram acondicionadas ao abrigo da luz a uma temperatura de 28°C por 5 dias. A germinação relativa das sementes (GRS), comprimento relativo das raízes (CRR) e índice de germinação (IG) foram determinados como segue:

- (I) $GRA (\%) = \frac{\text{número de sementes germinadas no extrato}}{\text{número de sementes germinadas no controle}} \times 100;$
- (II) $CRR (\%) = \frac{\text{comprimento médio da raiz no extrato}}{\text{comprimento médio da raiz no controle}} \times 100;$
- (III) $IG = (GRA \times CRR)/100\%.$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção dos *Streptomyces* spp. produtores de biossurfactante

A redução da tensão superficial do meio de cultivo foi usada como parâmetro para indicar a produção de biossurfactante pelos micro-organismos e os resultados estão descritos na Tabela 3. A tensão superficial dos meios de produção A e B foram reduzidas de 58,98 mN/m para valores inferiores a 29,63 mN/m. O isolado *Streptomyces* sp. DPUA1566 apresentou o menor valor de tensão superficial (25,27 mN/m) em relação ao controle.

Dentre as 10 amostras de *Streptomyces* spp. testadas nove reduziram a tensão superficial do meio B e apenas, a espécie *Streptomyces* sp. DPUA1572 reduziu a tensão superficial do meio A para valores menor que 30 mN/m.

Tabela 3 - Tensão superficial do biossurfactante dos 41 isolados de *Streptomyces* spp. após 144 horas de cultivo nos meios (A) e (B)

<i>Streptomyces</i> spp.		Ts*	Ts	<i>Streptomyces</i> spp.	
DPUA	Meio A	Meio B	DPUA	Meio A	Meio B
1542	50,18	29,58	1578	50,32	40,39
1543	51,79	26,34	1579	50,61	49,98
1545	45,65	33,91	1580	48,71	47,54
1546	39,08	32,38	1581	50,94	45,03
1547	46,64	27,49	1582	42,31	49,41
1550	45,00	27,42	1583	42,97	44,23
1552	38,18	45,47	1585	44,31	39,12
1553	40,91	47,34	1586	50,22	40,96
1554	47,32	40,03	1587	49,02	49,01
1556	42,91	39,32	1591	45,90	31,85
1557	47,27	42,49	1595	47,08	27,01
1559	49,31	29,22	1598	50,03	41,03
1560	43,62	36,62	1600	46,55	42,85
1561	45,78	42,50	1602	48,85	43,18
1563	43,68	44,61	1605	48,75	35,67
1564	43,32	42,80	1606	48,49	40,65
1566	39,45	25,27	1609	45,16	31,09
1568	46,62	31,13	1610	44,89	49,86
1570	45,04	38,54	1611	48,87	27,06
1572	29,63	43,39	1612	45,39	43,80
1573	41,12	26,46	Controle	58,57	58,98

*Tensão superficial - mN/m

A produção de biossurfactante por actinomicetos tem sido pouco relatada. O biossurfactante glicolipídico de *Rhodococcus* sp. TA6 reduziu a tensão superficial da água para 30 mN/m (SHAVANDIA et al., 2011) enquanto que os lipídios de superfície

ativa produzidos por *Nocardia* sp. B4 reduziu a tensão da água para 29 mN/m (KHOPADE et al., 2012b). Estes resultados são inferiores aos apresentados neste trabalho.

Nos últimos anos, vários metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* estão sendo estudados. No entanto, os dados sobre a produção de biossurfactante recentes são escassos. Khopade et al. (2012a) caracterizou um biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. B3 isolado de ambientes marinhos que reduziu a tensão superficial da água de 72 para 29 mN/m. Richter et al. (1998) utilizando *Streptomyces tendai* TU 901/8c produz um peptídeo hidrofóbico extracelular chamado streptofactin que diminuiu a tensão superficial da água de 72,0 para 39,4 mN/m.

Um produtor potencial de biossurfatante deve ser capaz de reduzir a tensão superficial do meio de cultivo para valores inferiores a 30 mN/m. Portanto, o presente estudo resultou na seleção de 10 amostras de *Streptomyces* spp. da coleção DPUA produtoras de biossurfactante (1542, 1543, 1547, 1550, 1559, 1566, 1572, 1573, 1595 e 1611) e foram utilizados na continuidade dos estudos.

3.2 Seleção dos resíduos de baixo custo

A produção de biossurfactante pelas dez isolados de *Strptomyces* spp. da coleção DPUA (1542, 1543, 1547, 1550, 1559, 1566, 1572, 1573, 1595 e 1611) selecionadas usando substratos como milhocina, óleo residual de motor e óleo de soja residual de frituras estão apresentados na Tabela 4.

Os melhores substratos para a produção de biossurfactantes foram selecionados com base no rendimento de biossurfactante isolado e na redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células.

Em todos os substratos testados ocorreram o crescimento dos micro-organismos e produção de biossurfactantes. O maior rendimento em biossurfactante isolado (1,91g/L) foi obtido utilizando o meio (II) constituído dos resíduos de milhocina e óleo de soja residual de frituras a partir do *Streptomyces* sp. DPUA1566. Os valores da tensão superficial dos 10 isolados testados variaram de 41,23 a 26,16 mN/m.

Tabela 4 - Valores da tensão superficial e rendimento em biossurfactante dos dez isolados de *Streptomyces* spp. DPUA em diferentes meios de culturas, após 144 horas de cultivo

<i>Streptomyces</i> DPUA	Meio I		Meio II		Meio III		Meio IV	
	Ts*	Rd**	Ts	Rd	Ts	Rd	Ts	Rd
1542	42,75	0,03	39,79	0,18	52,56	0,01	36,48	0,67
1543	44,49	0,02	41,23	0,08	44,33	0,01	32,41	0,95
1547	46,78	0,01	37,34	0,11	45,54	0,01	34,98	0,84
1550	38,30	0,12	32,67	0,34	42,81	0,02	26,78	1,53
1559	42,82	0,03	36,71	0,21	42,24	0,02	28,42	1,34
1566	41,03	0,02	26,16	1,91	50,18	0,01	24,72	1,87
1572	45,93	0,01	33,21	0,43	48,02	0,01	38,79	0,31
1573	37,36	0,15	37,59	0,10	56,32	0,01	39,35	0,23
1595	41,26	0,02	30,08	0,98	53,07	0,01	29,08	1,25
1611	40,06	0,04	34,12	0,09	48,76	0,01	33,52	0,56
Meio	52,89	nt	52,38	nt	59,32	nt	58,85	nt

* Tensão superficial (mN/m); ** Rendimento (g/L)

O menor valor da tensão superficial (24,72 mN/m) foi alcançado no meio IV constituído de peptona e óleo de soja residual de frituras. No entanto, foi observado um rendimento em biossurfactante de 1,87 g/L menor que os obtidos pelo meio II.

Apesar do meio IV apresentar menor valor da tensão superficial, o meio II foi selecionado por ser formulado exclusivamente por resíduos agro-industriais de baixo custo. A tensão superficial dos líquidos metabólicos foram superiores a 40 mN/m quando o óleo de motor residual (meio III) foi usado como fonte de carbono. A partir dos resultados obtido o isolado *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi selecionado como sendo o micro-organismo de maior potencial para a produção de biossurfactante utilizando

resíduos agro-industriais considerados de baixo custo como a milhocina e o óleo de soja residual de frituras. Estes resultados são promissores uma vez que, a utilização em escala industrial dos biossurfactantes tem sido limitada devido aos altos custos de produção associados ao uso de substratos caros (FONTES et al., 2008).

A estratégia de utilização de resíduos agroindustriais com a perspectiva de redução de custo de produção de biossurfactante como os usados neste trabalho, tem sido realizada por diferentes pesquisadores que utilizaram o glicerol, óleos residuais de frituras, melão, milhocina, manipueira e soro de leite como substratos (NITSCHKE; PASTORE, 2006; RODRIGUES et al., 2006, COSTA et al., 2008, SOBRINHO et al., 2008, SILVA et al., 2010, FARIA et al., 2011, VAZ et al., 2012).

A seleção de um substrato adequado é um passo crucial para a produção de biossurfactante (GALLERT; WINTER, 2002). De acordo com Maneerat (2005) além da redução dos custos de produção do biossurfactante esta prática reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente.

Corroborando com os resultados apresentados neste trabalho, menores rendimentos de produção de biossurfactante foram reportados por Vaz et al. (2012) que conseguiram um rendimento de 0,15 g/L de biossurfactante purificado produzidos por *Bacillus subtilis* a partir de meio contendo 15% de glicerol. Maiores rendimento foram demonstrados por Silva et al. (2010) que utilizaram como fonte de carbono o glicerol (3%) para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* e obtiveram um rendimento de 8,0 g/L. Costa et al. (2010) reportaram um rendimento de 9,69 g/L do biossurfactante rhamnolipídio (9,69 g/L) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 a partir de manipueira e óleo de frituras residual. O melão de indústria açucareira foi utilizado para a produção de sifonolipídios por *Candida bombicola* com rendimento de 23,25 g/L (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009).

Sobrinho et al. (2008) também utilizaram a milhocina como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Os resultados obtidos demonstraram que o melhor rendimento (4,5 g/L) em biossurfactante isolado foi obtido em meio de cultivo contendo 2,5% de milhocina e 5% de resíduo de refinaria. Estes dados corroboram com os obtidos neste trabalho.

Cameota e Makkar (2004) afirmam que a utilização destes substratos (soro de leite, melaço, óleo residual de frituras) diminui o custo total de produção em até 30%, além de ser uma possível solução para reaproveitamento de resíduos agro-industriais.

Nawawi et al. (2010) reportam que apesar das investigações, a seleção do resíduo adequado ainda é um desafio. Pesquisadores estão enfrentando o problema de encontrar um resíduo com o equilíbrio certo na composição de carboidratos e lipídios para sustentar o crescimento do micro-organismo e obter a máxima produção de biossurfactante. Considerando que o maior problema para a expansão do mercado de biossurfactante é o custo de produção, o isolamento de novos micro-organismos e a utilização de resíduos constitui uma estratégia importante para a obtenção desta biomolécula em escala industrial (COSTA et al., 2010).

3.3 Curva de crescimento e produção

A curva de crescimento e produção de biossurfactante foi avaliada e os perfis de concentração de biomassa, pH, produção de biossurfactante, medidas da tensão superficial e índice de emulsificação frente ao óleo de soja, n-hexadecano, óleo de motor residual e óleo de motor estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

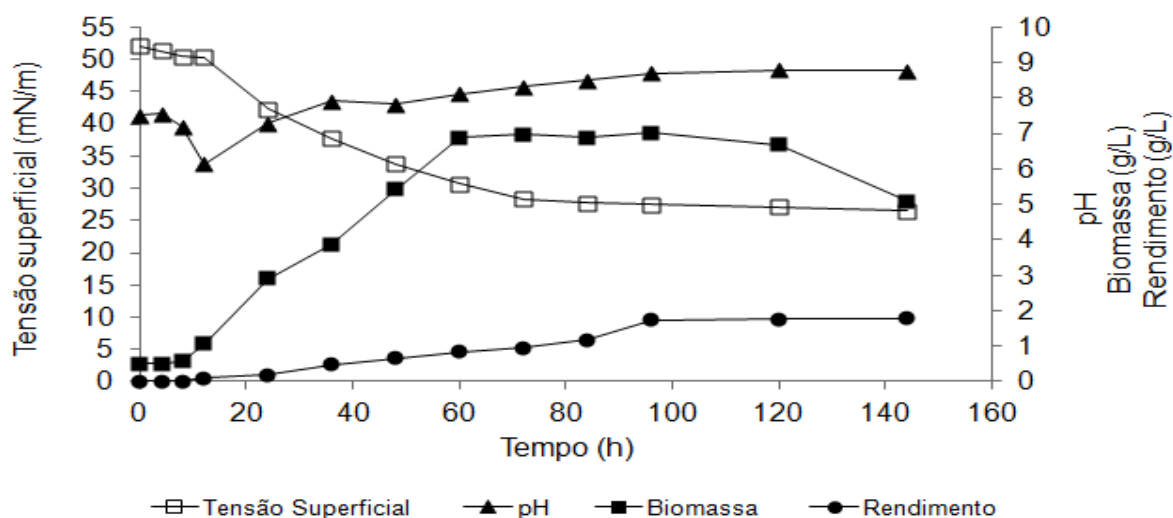


Figura 1 - Curva de crescimento, pH, tensão superficial e produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 em meio de cultivo contendo milhocina e óleo de soja residual de frituras, após 144 horas (Fonte: SANTOS, 2012)

Na Figura 1 observa-se que a produção de biossurfactante acompanhou o crescimento celular. A produção máxima de biossurfactante, com rendimento de 1,7 g/L, ocorreu na fase estacionária após 96 horas de cultivo e manteve-se estável até 144 horas, enquanto que o crescimento do *Streptomyces* sp. DPUA1566 atingiu o máximo em biomassa (7,01 g/L) após 96 horas de cultivo e atingiu a fase de declínio a partir de 120 horas.

Corroborando com estes resultados, Xia et al. (2011) reportaram a produção de biossurfactante durante a fase estacionária por *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Rhodococcus erythropolis*. Os valores de rendimentos obtidos foram de 2,66; 1,4 e 1,56 g/L, respectivamente, após 80 horas de cultivo.

O pH inicial do meio de produção diminuiu nas primeiras horas de crescimento para 5,7, atingindo valores maiores que 8,11 após 60 horas de cultivo e máximo de 8,76 ao final do processo (Figura 1).

De acordo com Schmidell e Faccioli (2001) esta redução no pH na fase lag de crescimento ocorre devido a adaptação do micro-organismo ao meio e a produção de ácidos orgânicos (ácido glucônico). Comportamento similares foram observados por Silva et al. (2010) durante a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*.

A tensão superficial do meio de produção foi reduzida para valores inferiores a 30 mN/m após 72 horas de fermentação e valores máximos de 26,53 mN/m foram alcançados na fase de declínio (Figura 1).

A redução da tensão superficial do meio de cultivo como um resultado da produção de biossurfactante e acumulação durante o período entre a fase estacionária e fase de declínio já foram estudadas (MULLIGAN, 2005; XIA et al., 2011). Valores inferiores de tensão superficial foram reportados por Amani et al. (2010) que demonstraram valores de 25 mN/m de tensão superficial do biossurfactante produzidos por *Bacillus subtilis*, após 60 horas de cultivo.

Os índices de emulsificação do biossurfactantes alcançaram valores máximos após 84 horas de crescimento do *Streptomyces* sp. DPUA1566 (Figura 2) para todos os hidrocarbonetos testados e se mantiveram estáveis até o final do processo fermentativo. Estes resultados revelam o excelente potencial do biossurfactante para

uso na indústria de alimentos e cosmético como agentes emulsionantes e na biorremediação de poluentes.

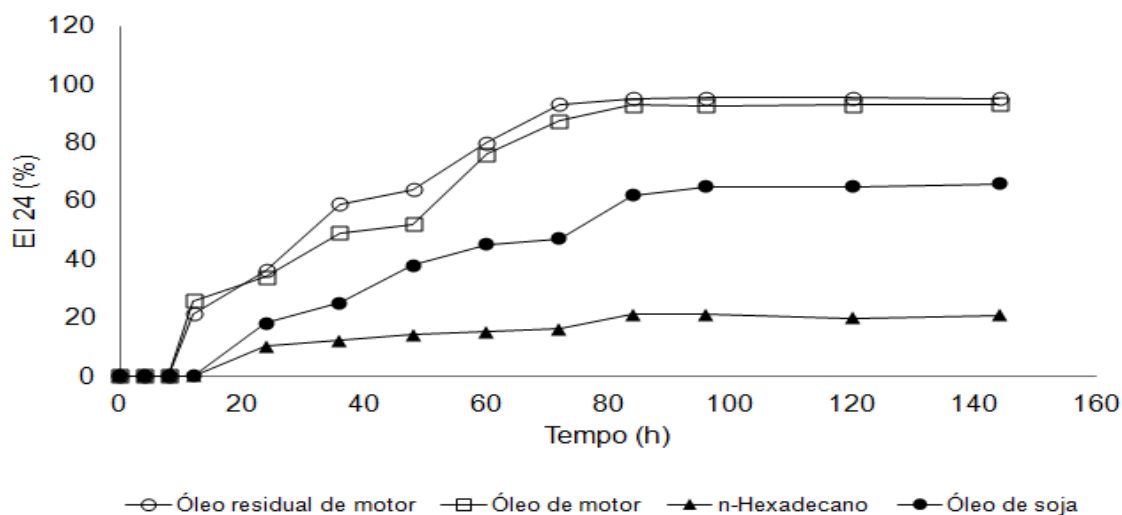


Figura 2 - Curva do índice de emulsificação do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566, após 144 horas de cultivo (Fonte: SANTOS, 2012)

A razão da síntese dos biossurfactantes pelas bactérias ainda não está bem esclarecida; todavia estes compostos estão relacionados à captação de substratos hidrofóbicos e ao aumento da difusão de substâncias insolúveis para o interior da célula (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; DAS; MUKHERJEE, 2005; MULLIGAN, 2005). Estes resultados indicam que a produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 atingiu valores máximos entre a fase estacionária de crescimento e fase de declínio, sugerindo que o biossurfactante produzido é um metabólito secundário.

3.4 Planejamento experimental

Os resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2^4 realizado para investigar os efeitos e interações das variáveis pH, RVMB, aeração e temperatura, sobre as variáveis respostas tensão superficial e o índice de emulsificação do biossurfactante de cultivos de *Streptomyces* sp. DPUA1566, após 144 horas, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições e resultados do planejamento fatorial completo 2⁴ selecionadas para produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 144 horas de cultivo

Ensaio	pH	RVME (%)	Agitação (rpm)	Temperatura (°C)	TS (mN/m)	IE-OMR (%)	IE-OS (%)
1	5,5	60	100	28	28,11	90,38	58,07
2	8,5	60	100	28	26,18	93,07	60,55
3	5,5	80	100	28	50,81	38,21	10,81
4	8,5	80	100	28	27,84	91,88	59,39
5	5,5	60	200	28	44,68	50,45	14,44
6	8,5	60	200	28	28,46	90,87	57,89
7	5,5	80	200	28	42,62	65,23	16,12
8	8,5	80	200	28	26,98	92,42	60,02
9	5,5	60	100	36	31,36	89,49	53,18
10	8,5	60	100	36	32,03	87,69	51,80
11	5,5	80	100	36	46,61	48,73	16,96
12	8,5	80	100	36	26,49	92,91	59,93
13	5,5	60	200	36	28,76	90,75	59,21
14	8,5	60	200	36	32,98	83,14	52,37
15	5,5	80	200	36	36,33	80,37	46,57
16	8,5	80	200	36	26,70	92,89	59,24
17	7	70	150	32	26,14	95,18	61,87
18	7	70	150	32	26,28	94,42	60,91
19	7	70	150	32	26,50	93,87	60,11
20	7	70	150	32	26,37	94,62	60,75

TS - tensão superficial; IE-OMR – índice de emulsificação frente ao óleo de motor residual; IE-OS - índice de emulsificação frente ao óleo de soja.

A partir das respostas obtidas para a tensão superficial, índice de emulsificação frente ao óleo residual de motor e índice de emulsificação frente ao óleo de soja foram construídos os diagramas de Pareto, ilustrados nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente.

No diagrama de Pareto de efeitos estimados em valores absolutos de tensão superficial, ilustrado na Figura 3, observa-se que para o nível de confiança de 95%, as variáveis independentes pH (1), temperatura (4), agitação (3) e as interações entre 1 e 2, 2 e 3, produziram efeitos negativos, estatisticamente significativos, enquanto que a variável independente RVME (2) e a interação 1 e 4 apresentaram efeitos positivos, estatisticamente significativos, o que significa que maiores valores de pH, temperatura e agitação e, menores valores da RVME levam a valores menores da tensão superficial. Esta inversão foi estabelecida pelo fato de que a redução da tensão superficial do meio de cultivo tem sido utilizada como parâmetro para indicar a produção de biossurfactante por vários pesquisadores (SARUBBO et al., 2001; 2006; NITSCHKE; PASTORE, 2006; SOBRINHO et al., 2008; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010; SILVA et al., 2010; FARIA et al., 2011; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2011; VAZ et al., 2012).

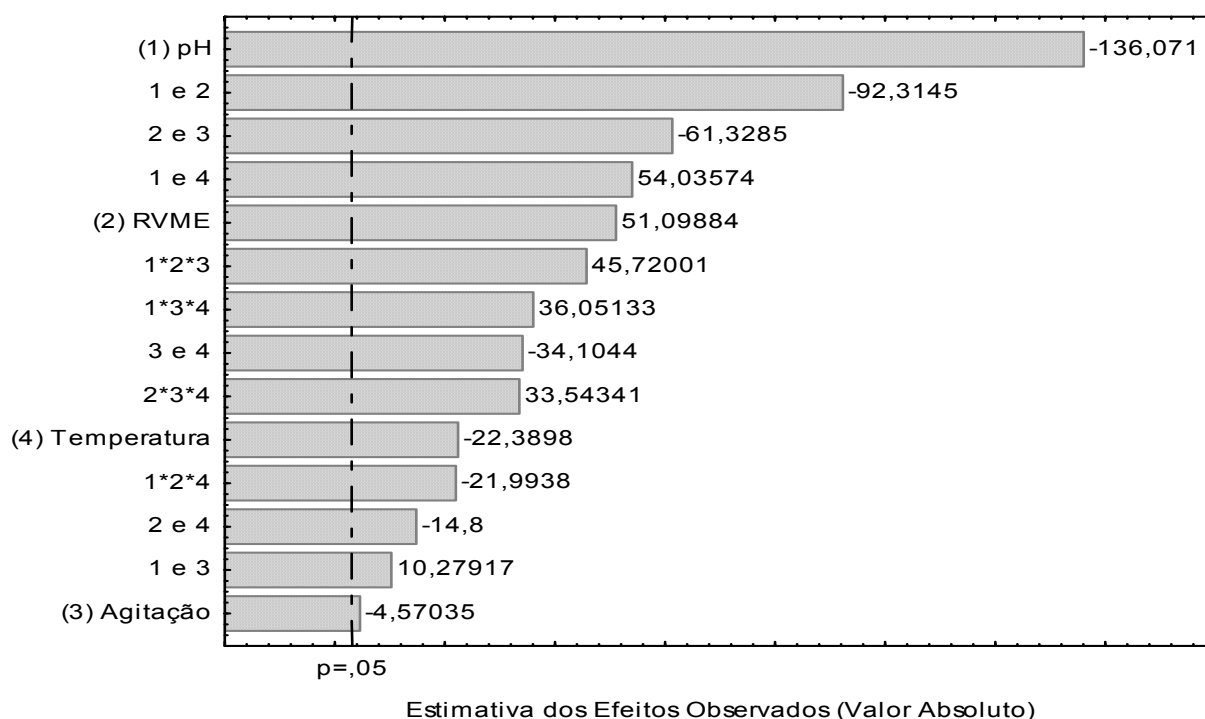


Figura 3 - Diagrama de Pareto sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo

No diagrama de Pareto de efeitos estimados, ilustrado na Figura 4, observa-se que para o nível de confiança de 95%, as variáveis independentes pH (1), agitação (3) e temperatura (4), e as interações 2 e 3, 1 e 2, produziram efeitos positivos, estatisticamente significativos, enquanto que a variável independente RVME (2) e a interação 1 e 4, produziram efeitos negativos, estatisticamente significativos, o que significa que maiores valores de pH, agitação e de temperatura e, menores valores de RVME favorecem o aumento dos valores dos índices de emulsificação frente ao óleo residual de motor.

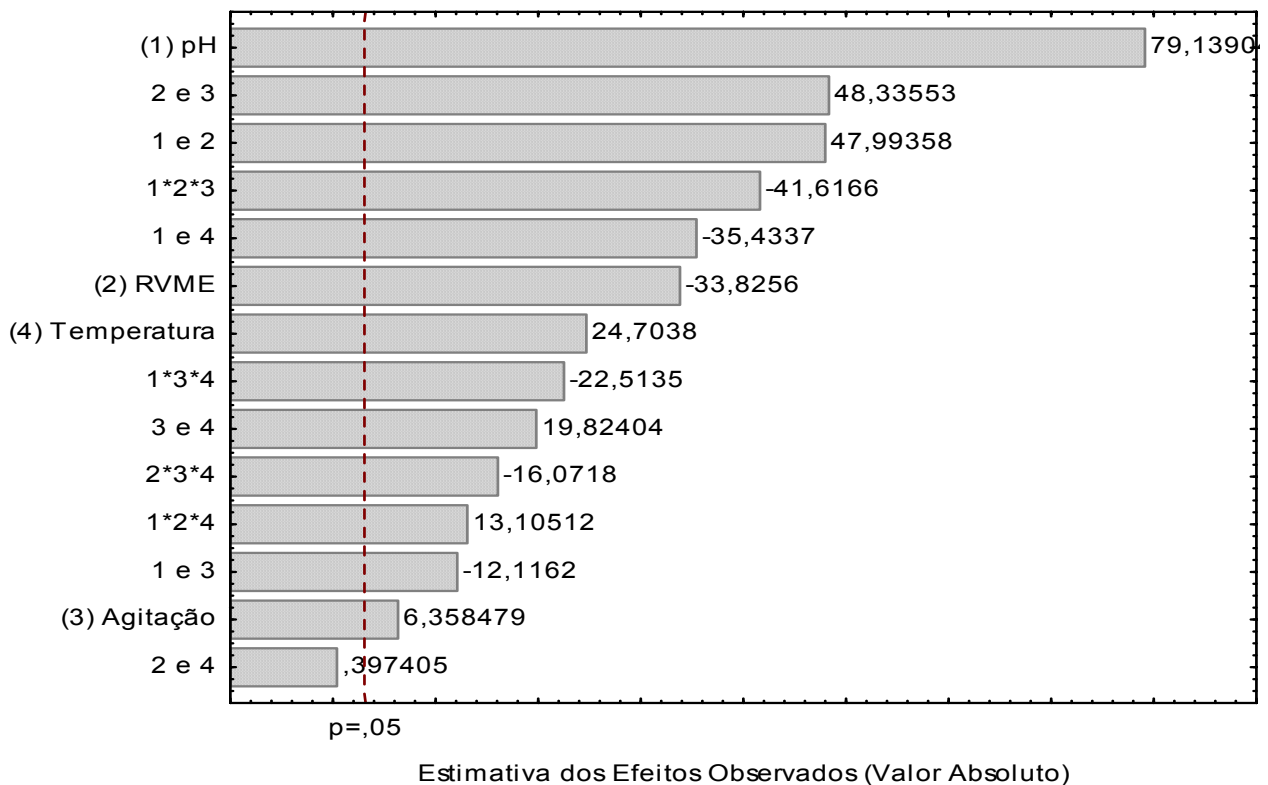


Figura 4 - Diagrama de Pareto sobre o índice de emulsificação frente ao óleo de motor residual do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo

No diagrama de Pareto de efeitos estimados, ilustrado na Figura 5, observa-se que para o nível de confiança de 95%, as variáveis independentes pH (1) e temperatura

(4), e as interações 1 e 2, 3 e 4, produziram efeitos positivos, estatisticamente significativos, enquanto que a variável independente RVME (2) e a interação 1 e 4, produziram efeitos negativos, estatisticamente significativos, o que significa que maiores valores de pH e de temperatura e, menores valores de RVME favorecem o aumento dos índices de emulsificação frente ao óleo de soja.

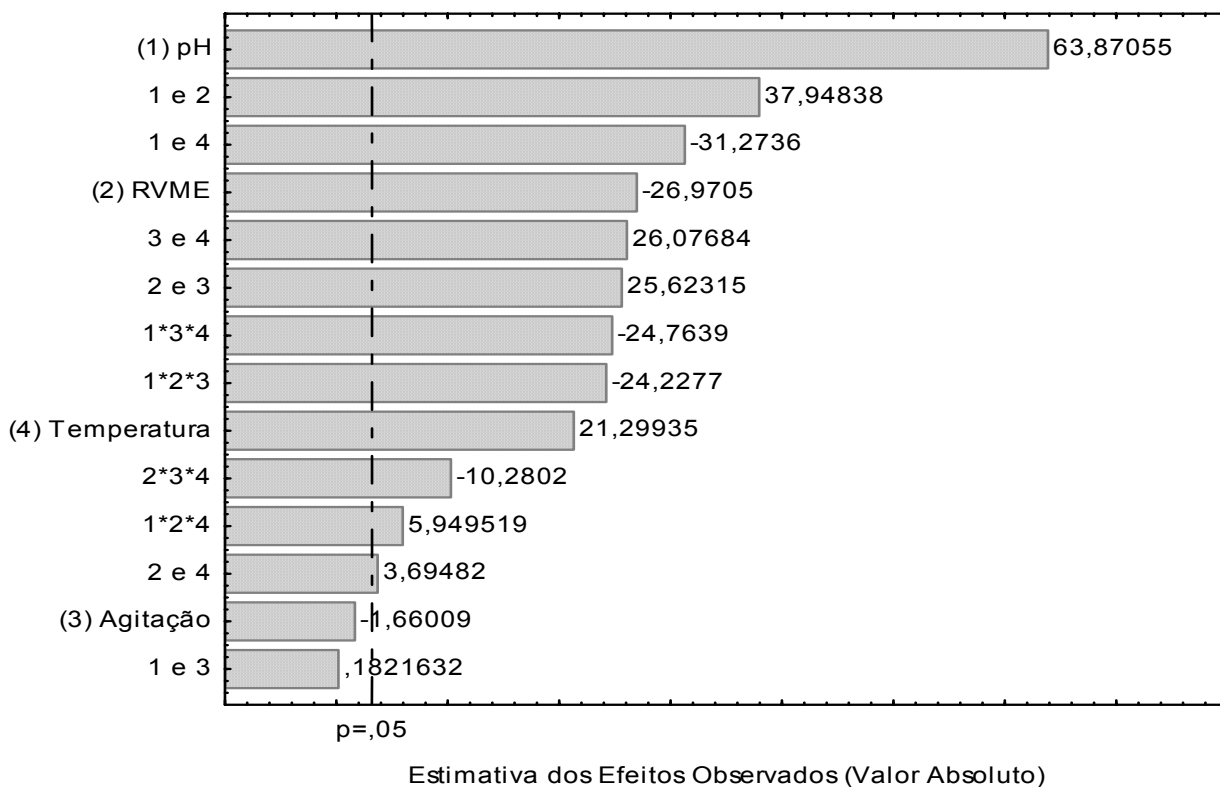


Figura 5 - Diagrama de Pareto sobre a variável índice de emulsificação frente ao óleo de soja do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo

As Figuras 1, 2 e 3 mostram que o pH e a oxigenação foram as variáveis de maior efeito nas respostas tensão superficial e índice de emulsificação para óleo de motor residual e óleo de soja. Conforme os resultados obtidos na Tabela 5 verifica-se que o *Streptomyces* sp. DPUA1566 possui potencial para a produção de biossurfactante, pois os valores obtidos da tensão superficial foram inferiores a 30 mN/m. A maior redução da tensão superficial ocorreu no ponto central (26,14 mN/m).

Os resultados dos ensaios 2, 8, 12 e 16 apresentados na Tabela 5 demonstram valores de tensão superficial próximos aos valores obtidos no ponto central. Portanto, as melhores condições de cultivo para a produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foram pH 7,0, temperatura de 32°C, RVME de 70% e agitação de 150 rpm.

De acordo com Kiran et al. (2009) uma das características importantes para a maioria dos micro-organismos é sua dependência do pH para o crescimento celular e produção de metabolitos secundário. O efeito positivo do pH na produção de biossurfactante tem sido demonstrado em muitos trabalhos na literatura e corroboram com os resultados alcançados neste trabalho quando a máxima produção foi alcançada a valores de pH 8,7.

Como por exemplo Liu et al. (2010) estudaram a influência do pH inicial na produção do biossurfactante por *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 e observaram que o maior rendimento (3,42 g/L) foi obtido em pH 9,35. Kiran et al. (2009) reportaram que *Aspergillus ustus* MSF3 apresentou maior produção de biossurfactante (15%) a pH 7,0 mesmo com o maior crescimento em pH 8 e 9. O *Bacillus subtilis* foi capaz de produzir o biossurfactante surfactina em uma faixa de pH de 6,0 a 9,0, embora o rendimento máximo do biossurfactante foi obtido em pH 7,0 (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008).

O efeito do pH em relação à produção de biossurfactante por *Candida antarctica* foi estudado utilizando tampão fosfato em diferentes pH (4-8). Todos os tampões utilizados resultaram em uma diminuição do rendimento da produção do biossurfactante, quando comparados com a água destilada (KITAMOTO et al., 2001). Resultados próximos aos achados neste trabalho forma reportados por Zinjarde e Pant (2001). Estes pesquisadores descreveram demonstraram que a influência do pH inicial na produção do biossurfactante por *Yarrowia lipolytica* e observaram que o maior rendimento foi obtida em pH inicial igual a 8,0.

Outros fatores que afetaram a produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foram à agitação e a RVME. Estes dois fatores influenciam a produção de biossurfactante por facilitar a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa (FONTES et al., 2008). Corroborando com este estudo Fontes et al. (2010)

reportaram que a produção de biossurfactante em biorreator por *Yarrowia lipolytica* foi influenciado pelo sistema de aeração e velocidade de agitação.

Os resultados mostram que à medida que a velocidade aumentava de 160 rpm para 250 rpm, a tensão superficial declinou para 20,9 mN/m. Yeh et al. (2006) observaram a produção do biossurfactante lipopeptídeos (surfactina) por *Bacillus subtilis* em um biorreator. A melhor condição foi alcançada a 300 rpm e com rendimento de 190 mg/L/h de surfactina.

A maioria das fermentações realizadas para produção de biossurfactante ocorre em uma faixa de temperatura de 25 a 30°C. Neste trabalho foi observado que menores valores de temperatura favoreceram a produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 como observado no ensaio 2 (Tabela 5). Valores maiores que os utilizados neste trabalho foram usadas por Najafi et al. (2011) na produção de biossurfactante por *Paenibacillus alvei*. O máximo rendimento foi obtido a 34,76°C.

No entanto, em temperaturas mais baixas e maiores que 34,76°C ocorreu declínio na produção. Casas e Garcia–Ochoa (1999) mostraram que as quantidades de soforolípídeo (120 g/L) obtidas por *Candida bombicola* em ambas as temperaturas (25 e 30°C) foram próximas. A fermentação realizada a 25°C apresentou crescimento menor de biomassa e maior taxa de consumo de glicose em comparação à fermentação realizada a 30°C.

O controle e a otimização das condições de pH, temperatura e aeração são fundamentais para o sucesso da ampliação de escala de produção de biossurfactante e pode contribuir para torná-lo competitivo em relação aos surfactantes químicos (FONTES et al., 2008).

3.5 Toxicidade do biossurfactante

A toxicidade frente à *Artemia salina* é um ensaio biológico usado para a avaliação preliminar de toxicidade e tem sido utilizado para testar compostos bioativos. O teste de letalidade com *Artemia salina* L. é um método simples na pesquisa de toxicidade de metabólitos secundários (MEYER et al., 1982), que possui uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral in vivo (PARRA et al., 2001).

O procedimento determina valores de concentração letal média (CL50), em µg/mL, de compostos metabólicos e extratos vegetais, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade por este teste (MEYER et al., 1982).

No presente estudo, o biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi testado a sua toxicidade em um bioensaio utilizando *Artemia salina*. O biossurfactante nas concentrações de CMC, 1, 10 e 100 mg/mL não causaram letalidade a *Artemia salina* após 24 horas de incubação.

Os resultados aqui obtidos são similares aos achados de Saeki et al. (2009) quando reportaram que o biossurfactante produzido pela bactéria *Gordonia* sp. (ordem *Actinomycetales*) foram pouco tóxicos contra duas espécies de larvas marinhas *Mysidopsis bahia* (camarão) e *Menidia beryllina* (peixe), apresentando uma dose letal de 116,5 ppm. Silva et al. (2010) verificaram a ausência de toxicidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 175 mg/L frente a *A. salina*, após 24 horas.

O índice de germinação, que combina medidas de germinação de sementes e alongamento em relação a raiz, tem sido usado para avaliar a toxicidade dos biossurfactantes em alface e repolho (TIQUIA et al., 1996).

Os resultados dos índices de germinação de 189, 110, 105, 96% para alface e 201, 128, 113, 113% para o repolho indicaram que as soluções testadas não mostraram efeitos fitotóxicos. Um valor do índice de germinação de 80% tem sido usado como um indicador da ausência de fitotoxicidade (TIQUIA et al., 1996).

Estes resultados obtidos com o biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 são similares aos reportados por Silva et al. (2010) que verificaram a ausência de efeitos fitotoxicidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de 175, 350, 525 e 700 mg/L, sobre a germinação de sementes e alongamento da raiz de repolho apresentando índices de germinação de 245, 187, 132 e 86%, respectivamente.

De acordo com vários autores um biossurfactante para aplicação pelas indústrias farmacêutica, alimentos, cosmética e petróleo, tem que apresentar baixa toxicidade (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN et al., 2002; COSTA et al., 2008).

4. CONCLUSÃO

Os estudos realizados com as linhagens de *Streptomyces* spp. da coleção DPUA isoladas de líquens da Região Amazônica revelaram dez potenciais micro-organismos produtores de compostos com atividade surfactante e emulsificante, destacando-se entre elas o isolado *Streptomyces* sp. DPUA1566 como o melhor produtor do biocomposto.

Dentre as variáveis utilizadas o pH e a relação do volume do meio e do volume do Erlenmeyer apresentaram efeitos significativos do ponto de vista estatístico na produção do biossurfactante.

O meio II constituído exclusivamente pelos resíduos agroindustriais milhocina e o óleo de soja residual de frituras se apresenta como alternativa atrativa e potencial na formulação de um meio de baixo custo para a produção de biossurfactante quando comparado ao meio padrão.

O biossurfactante produzido por *Streptomyces* spp. DPUA1566 isolado de líquens da Região Amazônica apresentou ausência de toxicidade frente à *Artemia salina*, *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleracea* L.

A nova linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA1566, cultivada em meio de baixo custo representa uma alternativa de produção de um novo biossurfactante, com potencial para aplicação nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M. et al. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 305-325. 2008.

AMANI, H. et al. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 75, p. 209-214. 2010.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Potencial commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508. 2000.

BERGEY MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Available from: <http://www.bergeys.org>. 2006. **The Prokaryotes - A Handbook on the biology of bacteria**. Third Edition Volume 3: Archaea. Bacteria: *Firmicutes*, *Actinomycetes*. 2006. p. 605-622.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as Emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and science. A - Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52. 1999.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266. 2004.

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

CASAS, J.; GARCIA-OCHOA, F. G. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 488-494. 1999.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from to *Bacillus species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229. 1987.

COOPER, D. G. et al. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412. 1981.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotenssoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34-38. 2008.

COSTA, S. G. V. A. O. et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1511-1516. 2010.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1015-1019. 2009.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 246-253. 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 499-504. 2009.

DELEU, J. D.; PAQUOT, M. From renewable vegetais resources to microorganisms: new trends in surfactnats. **Computers Rendus Chimie**, v. 7, p. 641-646. 2004.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Review**, v. 61, p. 47-64. 1997.

FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951-1957. 2011.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099. 2008.

FONTES, G. C. et al. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p 1-8. 2010.

FRANZETTI, A. et al. Cultural factors affecting biosurfactant production by *Gordonia* sp. BS29. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 943-947. 2009.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 483-496, 2002.

GANDHIMATHI, R. et al. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 825-835. 2009.

INBAR, E. et al. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of *Streptomyces*. **Microbial Ecology**, v. 50, p. 73-81. 2005.

JAVAHERI, M. et al. Anaerobic production of a bisurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Journal of Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 698-700. 1985.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311-318. 2012a.

KHOPADE, A. et al. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. **Desalination**, v. 285, p. 198-204. 2012b.

KITAMOTO, D. et al. Self-assemblies of glycolipid biosurfactants, mannosyl-erythritol lipids. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1709-1712. 2001.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256. 2009.

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

LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion I Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12-20. 2002.

LIU, J. et al. Optimization of biodemulsifier production from *Alcaligenes* sp. S-XJ-1 and its application in breaking crude oil emulsion. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, p. 466-473. 2010.

LUNA, J. M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP0995. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1527-1534. 2011.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A. New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP1002: Characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793. 2009.

MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434. 2002.

MANAM, R. R. et al. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro- β -lactone- γ -lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*. **Journal of Nature Products**, v. 68, p. 240-243. 2005.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683. 2005.

MEYER B. N. et al. *Brine shrimp* - A convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medical**, v. 45, p. 31-34. 1982.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **International Journal of Environment and Pollution**, v. 7, p. 362-366. 2004.

NAJAFIA, A. R. et al. Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 33-39. 2011.

NAWAWI, W. M. F. W.; JAMAL, P.; ALAM, M. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9241-9247. 2010.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. C.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2nd ed., Editora da Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brazil, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresourcer Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341. 2006.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SANDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, p. 395-400. 2001.

PRIDHAM, T. G. et al. A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, v. 1, p. 947-953. 1957.

RAHMAN, K. S. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology and Program**, v. 18, p.1277-1281. 2002.

RICHTER, M. et al. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 165-171. 1998.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142. 2006.

RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5. 2011.

SAEKI, H. et al. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 572-577. 2009.

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. 2006.

SARUBBO, L. A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59-67. 2001.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biociencia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, cap. 8, 2001, p. 179-192.

SHAVANDIA, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 477-482. 2011.

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183. 2010.

SOBRINHO, H. B. S. et al. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917. 2008.

STATISTICA STATSOFT Inc., (Data Analysis Software Systems) Version 8.0 (2008).

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249-256. 1996.

VAZ, D. A. et al. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 167-174. 2012.

XIA, W-J. et al. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 392, p. 124-130. 2011.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347. 2004.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 67-73. 2002.

Capítulo III

PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM
NOVO BIOSSURFACTANTE POR *STREPTOMYCES* SP. DPUA1566
ISOLADO DE LÍQUEN DA REGIÃO AMAZÔNICA

PRODUÇÃO, PROPRIEDADE E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM
NOVO BIOSSURFACTANTE POR *STREPTOMYCES* SP. DPUA1566
ISOLADO DE LÍQUEN DA REGIÃO AMAZÔNICA

PRODUCTION, PROPERTIES AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF
A NEW BIOSURFACTANT FROM *STREPTOMYCES* SP. DPUA1566
ISOLATED FROM LICHEN ON THE AMAZON REGION

Eduardo Francisco dos Santos¹, Leonie Asfora Sarubbo² e Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife-Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas bioativas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica e apresentam atividade superficial que permitem que a solubilização de substratos hidrófobos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção, propriedades e a caracterização parcial de um novo biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 utilizando milhocina e óleo de soja residual de frituras. O biossurfactante foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier e cromatografia gasosa. As melhores condições de cultivos para produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foram as seguintes: 3,0% de óleo de soja residual de fritura, 3% de milhocina, inóculo a 4% e relação entre o volume do meio e o volume do Erlenmeyer de 90%. A tensão superficial do meio foi reduzida 52,38 para 26,24 mN/m e os índices de emulsificação foram superiores a 90% para óleo de motor residual e de 60% para o óleo de soja. O biossurfactante apresentou estabilidade quando submetidos a 90°C durante 2 horas, temperaturas de até 120°C, salinidade de 2-12% de NaCl e a diferentes valores de pH (6-12). O biossurfactante apresentou um rendimento de 3,11 g/L, uma concentração micelar crítica (CMC) de 0,08% e reduziu a tensão superficial da água de 72 para 28,77 mN/m. O biossurfactante apresentou 84% de proteínas, 15% de lipídeos e foi caracterizado como uma lipoproteína denominado de Elan. O Bioelan produzido pelo isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1566 utilizando um meio de baixo custo representa um novo biossurfactante com propriedades potenciais para aplicações nas indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentos.

Palavras-chave: Biossurfactante, *Streptomyces*, Tensão superficial, milhocina

ABSTRACT

Biosurfactants and bioemulsifiers are amphiphilic compounds containing both a hydrophilic and a hydrophobic moiety and therefore are able to display a variety of surface activities that allow solubilisation of hydrophobic substrates. The objective of this study was to evaluate the production, properties and partial characterization of a new biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA1566 using corn steep liquor and soybean waste frying oil. The biosurfactant was characterized by Infrared Spectroscopy Fourier Transform and gas chromatography. The best conditions for the cultivation of the biosurfactant production by *Streptomyces* sp. DPUA1566 were as follows corn steep liquor 3%, soybean waste frying oil 3.0%, inoculum 4% and relationship between medium volume and flask volume from to 90%. The medium surface tension was reduced from 52.38 to 26.14 mN/m and emulsification index were above 90% to waste motor oil and 60% to soybean oil. The biosurfactant showed stability when submitted at 90°C during 2 hours, and thermal (4–120°C) and pH (6–12) stability regarding the surface tension reduction and the emulsification capacity of vegetable oils and hydrocarbons, and tolerance under high salt concentrations (2–12%). The isolated biosurfactant showed a yield of 3.11 g/L, critical micellar concentration (CMC) of 0.08% and reducing the superficial tension of the water from 72 to 28.77 mN/m. Biosurfactant showed 84% protein, 15% lipids and characterized as a lipoprotein called Bioelan. The Bioelan produced by a isolated of *Streptomyces* sp. DPUA1566 represents a new biosurfactant from using low cost with potential properties for applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industries.

Key Words: Biosurfactant, *Streptomyces*, Lipopeptide, Surface tension, Corn steep liquor

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas bioativas anfílicas produzidas por micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SARAVANAKUMARI; MANI, 2010). Estas moléculas são constituídas de uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, agem na interface entre as fases fluidas com diferentes polaridades, vinculando interfaces óleo/água ou água/óleo, reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre estas fases (BANAT et al., 2000).

A porção hidrofóbica é composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados. A porção hidrofílica pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato, peptídios (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; BOGNOLO, 1999). De acordo com a estrutura química da molécula podem ser classificados como lipopeptídios, glicolipídios, lipídios neutros, ácidos graxos, fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; BANAT, 1997; LANG, 2002).

Os biossurfactantes produzidos por via biotecnologia apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e a aceitação ecológica (MULLIGAN, 2004). Os biossurfactantes são aplicados nas indústrias farmacêuticas, cosmética, alimentos, agrícola, bebidas e petróleo (BOGNOLO, 1999; MULLIGAN et al., 2001; NITSCHKE; PASTORE, 2002; YOUSSEF et al., 2004).

O principal fator que restringe o uso dos biossurfactantes é o alto custo de produção quando comparados aos sintéticos. O uso de resíduos industriais e agroindustriais é uma alternativa viável, uma vez que a matéria-prima representa 10 a 30% de custos totais em um processo biotecnológico (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

Uma variedade de resíduos agroindustriais como os óleos residual de frituras, glicerol, melão, nanipueira, milhocina, soro láctico e resíduos de destilaria já foram utilizadas na produção de biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2006; RODRIGUES et al., 2006; COSTA et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009; SILVA et al., 2010; COSTA et al., 2010; FARIA et al., 2011; VAZ

et al., 2012). Além disto, o uso destes resíduos contribui para a redução da poluição ambiental e para a valorização econômica destes produtos (COSTA et al., 2008).

As bactérias das famílias *Pseudomonaceae* e *Bacillaceae* são as mais estudadas na produção desta biomolécula (CYBULSKI et al., 2003). Porém, nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas com outras bactérias na produção de biossurfactantes, como *Alcaligenes faecalis*, *Cronobacter sakazakii*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Serratia marcescens* (SARAVANAKUMARI; MANI, 2010; BHARALI et al., 2011; ROLDÁN-CARRILLO et al., 2011; THAVASI et al., 2011; JAIN et al., 2012).

A produção de biossurfactante por actinomicetos tem sido relatada. Vários actinomicetos isolados de ambientes marinhos foram usados na produção de biossurfactantes como a *Gordonia* sp. BS29, *Nocardiosis* sp. B4, *N. lucentensis* MSA04, *N. Alba*, *Rhodococcus* sp. e *R. ruber* (FRANZETTI et al., 2009; GANDHIMATHI et al., 2009; KIRAN et al., 2009 e 2010; GEIN et al., 2011; SHAVANDI et al., 2011; KHOPADE et al., 2012b).

No entanto, os dados sobre a produção de biossurfactante por *Streptomyces* recentes são escassos. Khopade et al. (2012a) observaram a produção de biossurfactante utilizando o *Streptomyces* sp. B3 isolados de ambiente marinho. Richter et al. (1998) reportaram a produção de um peptídeo hidrofóbico extracelular, denominado streptofactin por *Streptomyces tendae* TU 901/8c.

Dada a relevância industrial dos biossurfactantes, este trabalho tem por objetivo avaliar a produção, as propriedades e a caracterização parcial de um novo biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 utilizando meio de cultivo suplementado com resíduos agroindustriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manutenção do micro-organismo e inóculo

O *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi isolado a partir de líquens da Região Amazônica, pertencente à Coleção de micro-organismos do Departamento de

Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA), mantido em meio Agar ISP-2 (PRIDHAM et al, 1957), modificado pela retirada da glicose (extrato de levedura 0,4% v/v, extrato de malte de 1% v/v; agar 2% v/v), incubados em estufa bacteriológica a temperatura de 30°C, durante 24 horas. O inóculo para produção do biossurfactante foi realizado em frascos Erlenmeyer de 150 ml contendo 50 ml do meio caldo ISP-2 (extrato de levedura 0,4% v/v, extrato de malte 1% v/v, pH 7,0) e adicionados fragmentos de 6,0 mm de diâmetro, retirados da área central das culturas dos *Streptomyces* sp. DPUA1566, crescidos em meio agar ISP-2.

Os frascos foram mantidos em agitador orbital (B. BRAUN) a 150 rpm, 28°C, durante 48 horas. Alíquotas do fermentado (5 mL) foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL do meio líquido ISP-2 e agitados em Vórtex durante 10 segundos para atingir a concentração de 10^8 UFC/mL, o que correspondeu a uma solução padrão de McFarland a 0,5, ou seja, um valor de absorbância igual a 0,1 a 600nm.

2.2. Condições de produção do biossurfactante

A produção do biossurfactante foi conduzida em meio de cultivo constituído de milhocina e óleo de soja residual de frituras e suas concentrações estão definidas na Tabela 1. O óleo de soja residual de frituras (coletados em estabelecimento comercial) foi utilizado como fonte de carbono e a milhocina resíduo industrial do processamento de milho (coletado na Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, Brasil) como fonte de nitrogênio e minerais.

O experimento foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL. O pH do meio foi justado para 7,0 com uma solução de NaOH a 1,0 M e esterilizados em autoclave a 121°C/1 atm de pressão, durante 20 minutos. Em seguida foi acrescido 2% do inóculo padronizado do *Streptomyces* sp. DPUA1566, como descrito no item 2.1. As culturas foram incubadas em agitador orbital (B. BRAUN) a 200 rpm, 28°C, durante 96 horas.

Após 96 horas de cultivo do *Streptomyces* sp. DPUA1566 o líquido metabólico foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos, filtrado (papel de filtro, marca J. LABOR) a vácuo e submetido ao processo de extração. O pH do líquido metabólico livre de células

foi ajustado para 2,0 com uma solução de HCl a 6,0 M. Em seguida, iguais volumes de clorofórmio/metanol (2:1) e do líquido metabólico livre de células foram adicionados em funil de separação de 500 mL, sendo a mistura agitada de forma vigorosa por 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases (JAVAHERI et al., 1985). A fase orgânica foi removida e a operação repetida por mais duas vezes.

O produto obtido foi concentrado por centrifugação a 3000 x g por 5 min. O *pellet* formado foi removido e suspenso em água Milli-q e ajustado o pH para 7,0 com uma solução 1M de NaOH. A suspensão foi colocada em placas de Petri esterilizadas e evaporada a 37°C em estufa de secagem (Modelo QUIMIS) durante 12 horas, esfriadas em dessecador e pesada até peso constante para determinar o rendimento em g/L. O produto obtido foi considerado como biossurfactante isolado.

2.3 Planejamento experimental e análise estatística

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para verificar os efeitos e interações das variáveis: concentração de milhocina, concentração do óleo de soja residual de frituras, concentração do inóculo e a razão entre o volume médio e volume do Erlenmeyer (RVME) sobre as variáveis respostas tensão superficial e rendimento em biossurfactante. Um ponto central foi executado em quatro repetições para permitir a estimativa do erro experimental (NETO et al., 2002). Os valores das variáveis e níveis estão apresentados na Tabela 1. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados com o programa Statistica 6,1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Tabela 1- Valores e níveis das variáveis independentes usados no planejamento fatorial para produção de biossurfactante

Variáveis independentes	-1	Ponto central	+1
Concentração de milhocina (%)	1	2	3
Concentração do óleo residual de frituras (%)	1	2	3
Concentração do inóculo (%)	2	3	4
RVME (%)	70	80	90

2.4 Determinação da tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC)

A tensão superficial e a concentração micelar crítica do biossurfactante foi realizada em tensiômetro Sigma 700 (KSV Instruments Ltd., Finlândia) pelo método do anel Du Nouy (COOPER et al., 1981) a partir de uma solução a 3% do biossurfactante isolado. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.5 Determinação do Índice emulsificação (IE_{24})

O índice de emulsificação (IE_{24}) foi determinado utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987), onde o líquido metabólico livre de células foi adicionado a compostos hidrofóbicos (n-hexadecano, óleo diesel, óleo de motor residual, óleo de motor e os óleos de soja, milho, girassol, canola e pequi) em tubos de ensaio na proporção de 1:1 e homogeneizados em vortex, durante dois minutos. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura de 28°C, durante 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado pela razão entre a altura da camada emulsionada e a altura total dos componentes no tubo de ensaio e o valor mensurado multiplicado por 100. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.6 Estudo da estabilidade do biossurfactante

Os efeitos de diferentes temperaturas (4, 28, 40, 60, 80, 100 e a 121°C), diferentes tempo a temperatura constante de 90°C (10, 20, 40, 80, 100 e 120 minutos), de diferentes concentrações de NaCl (2,0; 4,0; 6,0; 8,0, 10,0 e 12%) e de diferentes valores de pH (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12) na atividade do biossurfactante foi avaliado no líquido metabólico livre de células após centrifugação a 10.000 x g, durante 20 minutos (SOBRINHO et al., 2008; SILVA et al., 2010). A estabilidade foi determinada através da tensão superficial e do índice de emulsificação. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.7 Avaliação do tempo de estocagem do biossurfactante

Para avaliação do tempo de estocagem do biossurfactante foram acondicionados 3,0 g do biossurfactante isolado em recipiente de vidro transparente

hermético e armazenado a temperatura de 28°C. A estabilidade do biossurfactante foi avaliado, após 3 e 6 meses de estocagem, quanto à manutenção da CMC.

2.8 Caracterização parcial do biossurfactante

2.8.1 Cromatografia em camada delgada

Para a realização da cromatografia foram utilizados 0,3 g do biossurfactante isolado solubilizado em 1,0 mL de clorofórmio, e uma alíquota de 200 µL foi aplicada em placa de sílica gel 60 (Merck) e eluída no sistema clorofórmio: metanol:água (65:15:2 v/v/v). Como reveladores foram utilizados vapores de iodo para identificação dos lipídios, ninhidrina (0,2% em acetona) e aquecimento das placas a 100°C por 15 minutos como revelador específico para grupos amino e ácido sulfúrico a 6,0 N com e aquecimento a 100°C para verificar a presença de aminoácidos. As soluções de α -Naftol (1% em etanol) e orcinol (0,19% em H₂SO₄) foram usadas para revelar a presença de carboidratos (PARRA et al., 1989; HOROWITZ, 1990).

2.8.2 Determinação de proteínas

A concentração de proteína do biossurfactante isolado foi determinada pelo método de Bradford (1976) com Coomassie azul brilhante G, através das medidas de absorbância a 595 nm usando como padrão albumina de soro bovino.

2.8.3 Determinação e extração de lipídios

A extração da parte lipídica do biossurfactante isolado foi realizada de acordo como descrito por Bligh e Dyer (1959), onde 2,0 g foram adicionados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 75 mL de n-hexano e colocados em mesa agitadora a 150 rpm, a 28°C, durante 12 horas. Em seguida, o solvente foi separado dos lipídios a pressão reduzida em evaporador rotativo. Os lipídios obtidos foram armazenados em recipientes de vidro âmbar e em seguida foram estocados em freezer (-18°C). O extrato residual após a extração foi dissolvido em água Milli-q e submetido ao teste de

dispersão do óleo em água para se verificar a presença de compostos com atividade superficial.

2.8.4 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo a gás modelo CG Máster, com detector de ionização de chama, coluna capilar (DB-WAX), fase estacionária polietilenoglicol (Carbowax 20M), com 30 m de comprimento por 0,53 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura do filme. Utilizou-se o hidrogênio como gás de arraste, numa vazão de 5,0 mL/min., nitrogênio (30 mL/min.) e hidrogênio (30 mL/min.) e ar sintético (300 mL/min.). O programa de temperatura do forno inicial foi o de 800°C, com graduação de 40°C/min até 1100°C, totalizando 250 min.

Uma alíquota de 1,0 µL dos lipídios esterificado de acordo com Hartman e Lago (1973) foi injetada no cromatógrafo e a identificação dos ácidos graxos foi feita através do tempo retenção de cada constituinte, por comparação com os tempos de retenção obtidos pela injeção de padrões autênticos de ésteres metílicos de ácidos graxos.

A partir dos cromatogramas obtidos, os ésteres metílicos foram identificados através do tempo retenção de cada constituinte, por comparação com os tempos de retenção obtidos pela injeção de padrões autênticos de ésteres metílicos de ácidos graxos Sigma - USA. A composição quantitativa foi calculada por integração das áreas dos picos constituintes da amostra. Foram considerados 100% a soma das áreas de todos os picos identificados.

2.8.5 Espectrometria de Infravermelho

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foram registrados em espectrômetro Varian (Modelo 640 IR). Uma amostra de 0,1 mg foi misturada a 100 mg de brometo de potássio (KBr), macerada e prensada na forma de pastilha. O espectro foi gerado no intervalo de comprimento de ondas de 4-4000, sendo o número de ondas expressos em cm^{-1} .

2.8.6 Teste de dispersão e agregação de óleo

O teste de dispersão e agregação do óleo foi realizado de acordo com Morikawa et al. (1993) modificado pelo tipo e volume do óleo utilizado. Um volume de 2,0 mL do óleo de motor residual foi colocado sobre a superfície da água Milli-q (40 mL) em uma placa de Petri esterilizada e em seguida 10 µL do biossurfactante bruto e isolado na concentração de 1,0 mg/mL foi colocada na superfície da película do óleo. A dispersão do óleo seguido de agregação foi verificada visualmente após 30 segundos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Planejamento fatorial

Os resultados obtidos da produção do biossurfactante utilizando o planejamento fatorial a partir das variáveis estudadas: concentração de milhocina, concentração do óleo de soja residual de frituras, concentração de inóculo e RVME, estão descritos na Tabela 2.

A partir das respostas obtidas para a tensão superficial e o rendimento em biossurfactante isolado construíram-se os gráficos de Pareto, indicados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. No diagrama de Pareto de efeitos estimados em valores absolutos de tensão superficial, ilustrado na Figura 1, observa-se que para o nível de confiança de 95%, as variáveis independentes concentração de milhocina (1), concentração do óleo de soja residual de frituras (2) e concentração do inóculo (3) e as interações entre 2 e RVME (4) produziram efeitos negativos, estatisticamente significativos, o que significa que maiores valores das variáveis (1), (2) e (3) levam a valores menores da tensão superficial.

A inversão reportada para o diagrama de Pareto, ilustrado na Figura 1, foi estabelecida pelo fato de que a redução da tensão superficial do meio de cultivo tem sido utilizada como parâmetro para indicar a produção de biossurfactante por vários pesquisadores (SARUBBO et al., 2001 e 2006; NITSCHKE; PASTORE, 2006; COSTA et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010; SILVA et al., 2010; FARIA et al., 2011; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2011; VAZ et al., 2012).

Tabela 2 - Resultados do planejamento fatorial completo para produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo

Ensaio	Milhocina (%)	Óleo Frituras (%)	Inóculo (%)	RVME (%)	Tensão	
					superficial (mN/m)	Rendimento (g/L)
1	1	1	2	70	27,31	1,79
2	3	1	2	70	27,45	2,24
3	1	3	2	70	27,89	1,93
4	3	3	2	70	27,01	2,37
5	1	1	4	70	27,99	2,02
6	3	1	4	70	26,45	2,34
7	1	3	4	70	27,07	2,45
8	3	3	4	70	27,56	2,75
9	1	1	2	90	27,99	2,04
10	3	1	2	90	28,32	1,99
11	1	3	2	90	27,41	2,23
12	3	3	2	90	26,58	2,97
13	1	1	4	90	27,79	1,67
14	3	1	4	90	27,06	2,31
15	1	3	4	90	27,28	3,01
16	3	3	4	90	26,24	3,11
17	2	2	3	80	27,04	2,67
18	2	2	3	80	26,92	2,81
19	2	2	3	80	26,77	2,86
20	2	2	3	80	26,93	2,69

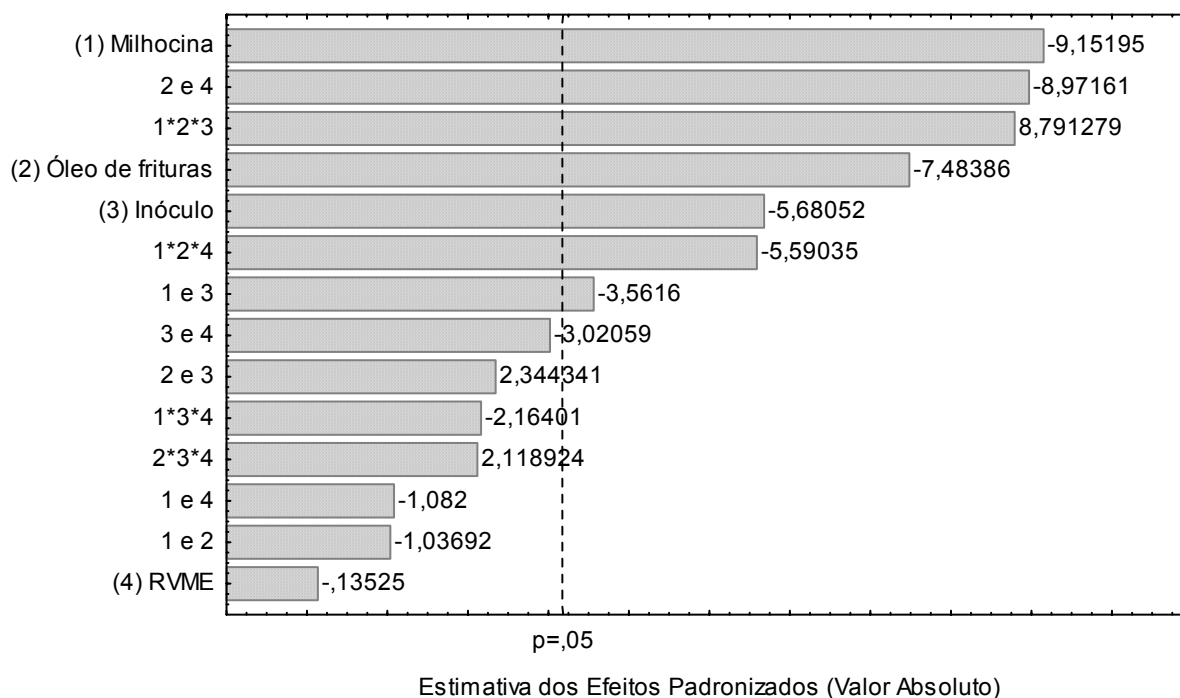


Figura 1 - Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis avaliadas sobre a tensão superficial do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo

No diagrama de Pareto de efeitos estimados em valores absolutos de tensão superficial, ilustrado na Figura 2, mostra que para o nível de confiança de 95%, todas as variáveis independentes concentração de milhocina (1), concentração do óleo de soja residual de frituras (2), concentração do inóculo (3) e RVMA (4) e as interações entre 2 e 4, 2 e 3 produziram efeitos positivos, estatisticamente significativos, o que significa que maiores valores destas variáveis levam a maiores rendimentos de biossurfactante isolado.

Conforme os valores obtidos na Tabela 2 verifica-se que os maiores rendimentos em biossurfactante isolado (3,11 g/L) e o menor valor da tensão superficial (26,24 mN/m) ocorreram no ensaio 16 (concentração de milhocina 3%, concentração do óleo de soja residual de frituras 3%, concentração de inóculo 4%, RVME 90%). Verificou-se que ambos os resíduos possuem potencial para a produção de biossurfactante, pois todos os valores obtidos neste trabalho foram superiores a 1,67 g/L.

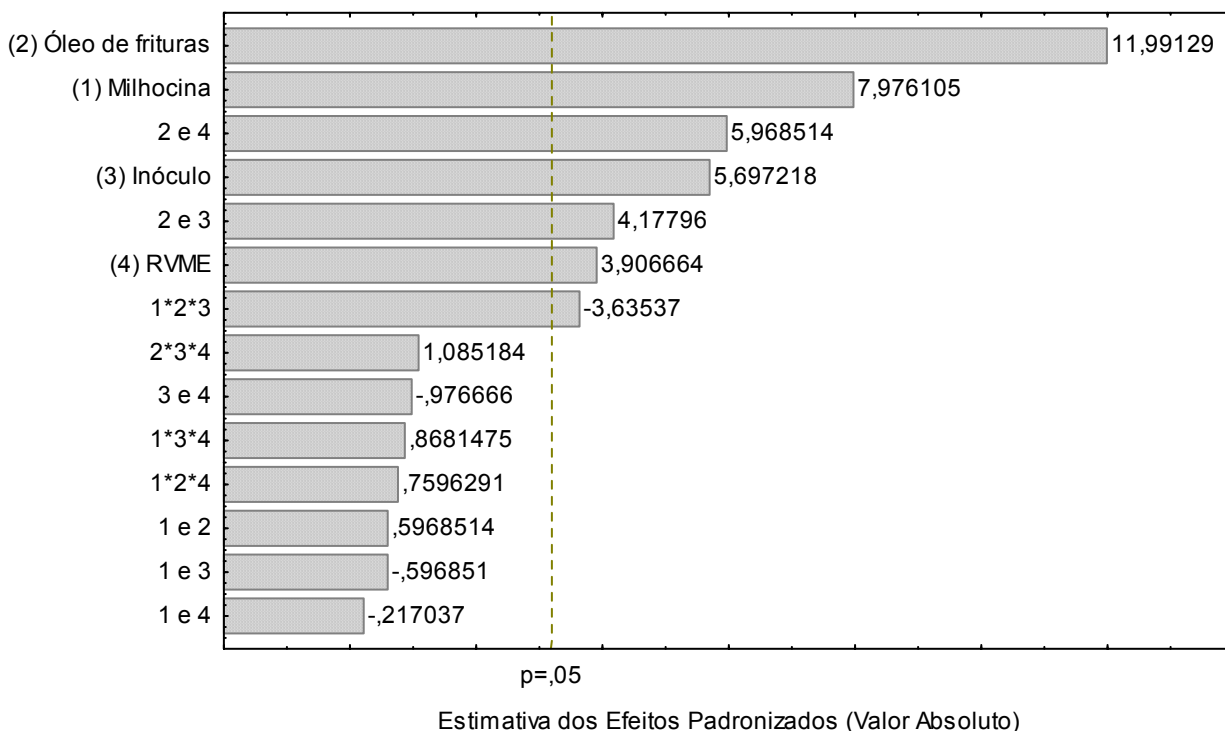


Figura 2 - Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis avaliadas sobre o rendimento do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 96 horas de cultivo

Vários são os estudos voltados à influência das fontes de carbono e nitrogênio, mostrando que são parâmetros importantes na produção de biossurfactante.

A influência da concentração da fonte de carbono e fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*, também foi reportada por Andrade et al. (2006). Neste estudo foi realizado um planejamento fatorial completo para avaliar estatisticamente os principais efeitos entre as variáveis: concentração de manipueira como fonte de carbono e de sulfato de amônio e de ureia como fontes de nitrogênio. De acordo com os resultados, a redução da tensão superficial foi significativa em maior concentração de manipueira (10%) e menor concentração de sulfato de amônio e uréia.

Nitschke et al. (2005) utilizaram diferentes fontes de carbono (glicerol e glicose, óleo de fritura e gordura de frango) para a produção de ramnolipídios e verificaram que os substratos oleosos apresentaram uma produção de ramnolipídios 64% maior do que

os substratos não oleosos. De acordo com Fontes et al. (2008) para obtenção de rendimentos maiores de biossurfactante é de fundamental importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo.

Valores superiores aos achados neste trabalho foram reportados por Sobrinho et al. (2008) quando a *Candida sphaerica* UCP0995 foi cultivada em meio contendo milho-cina como fonte de nitrogênio, demonstrando um rendimento de 4,5 g/L. Estudos realizados por Rufino et al (2007) verificaram, também um rendimento maior (4,5 g/L) quando *Candida lipolytica* foi cultivada em meio contendo um resíduo de refinaria de óleo de soja, após 96 horas de cultivo, com redução da tensão superficial do meio para 26 mN/m.

Vários outros substratos derivados de resíduos de amido, como efluente da indústria de processamento de arroz, águas residuais do processamento de cereais e melaço são substratos em potencial para o crescimento microbiano e a produção de biossurfactantes (MUKHERJEE et al., 2006). Esses resíduos são obtidos a baixo custo das respectivas indústrias de processamento e constituem potentes substratos para a produção de biossurfactantes em escala industrial (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Diversos estudos com óleos derivados de plantas (soja, milho, amendoim) demonstraram que podem constituir matérias-primas eficazes e baratas na produção de biossurfactantes (MUKHERJEE et al., 2006) a exemplo do óleo de soja residual de frituras utilizados neste trabalho. O óleo de oliva, também, foi usado como fonte de carbono na produção de um biossurfactante produzido pela actinobactéria *Nocardioopsis* sp. e foi verificado a redução da tensão superficial da água de 72 para 29 mN/m, em 6-9 dias de cultivo (KHOPADE et al., 2012b). Estes resultados são inferiores aos obtidos resultados alcançados com o biossurfactante produzidos pelo *Streptomyces* sp. DPUA1566. Neste trabalho foram obtidos valores de tensão superficial que variaram 27,99 a 26,24 mN/m utilizando várias concentrações da fonte de nitrogênio e de carbono (Tabela 2).

Resultados inferiores aos achados neste trabalho foram demonstrados por Luna et al. (2009) que avaliaram a influência do óleo de algodão (7,5%) como fonte de carbono na produção de biossurfactante por *Candida glabrata*. O biossurfactante isolado mostrou uma concentração micelar crítica (CMC) de 2,5% e uma tensão superficial de

31 mN/m. Porém, resultados superiores foram reportados por Thavasi et al. (2011) quando demonstraram que a bactéria *Lactobacillus delbrueckii* cultivada em meio de produção constituído de borra de óleo de amendoim como fonte de carbono, produziu biossurfactante com rendimento de 5,35 mg/L.

Os resíduos oleosos estudados são produzidos em grande quantidade pelas indústrias de processamento de óleos vegetais e alimentícias, sendo que a utilização destes resíduos poderá contribuir não somente com a redução dos custos de produção, mas também com a valorização econômica destes (COSTA et al., 2008).

3.2 Estabilidade do biossurfactante

A estabilidade do biossurfactante bruto produzidos por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi avaliada no líquido metabólico livre de células frente a diferentes valores de pH , temperatura e concentrações de NaCl em função da tensão superficial e índice de emulsificação. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Os resultados demonstraram que o biossurfactante bruto presente no líquido metabólico livre de células apresenta estabilidade em relação à variação dos valores de pH (6-12) e concentração de NaCl (2-12%). Quando são avaliados os efeitos do tratamento térmico nas diferentes temperaturas (4-120°C) e diferentes intervalos de tempos a temperaturas constantes a 90°C, é possível observar que não houve mudanças maiores nos valores da tensão superficial e dos índices de emulsificação do biossurfactante bruto.

Os resultados apresentados neste trabalho são próximos aos valores reportados por Khopade et al. (2012a) que observaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. B3 frente a variações de pH de 8 a 12, temperatura de 100°C e concentração salina (NaCl) de até 9% e próximos aos obtidos por Khopade et al. (2012b) que reportaram estabilidade do biossurfactante produzido por *Nocardiosis* sp. B4. em relação aos parâmetros estudados (pH 8-12, concentração salina de até 8% e temperatura de 100°C). As características reportadas neste trabalho representam uma vantagem adicional ao biossurfactante avaliado, pois mesmo quando submetido a condições mais extremas de pH, temperatura e concentrações salinas as suas propriedades originais são preservadas.

Tabela 3 - Estabilidade do biossurfactante em diferentes concentrações de sal, temperatura, pH e tempo de aquecimento a 90°C do líquido metabólico livre de células de *Streptomyces* sp. DPUA1566

	Tensão superficial (mN/m)	Índice de emulsificação – IE (%)			
		Óleo de motor residual	Óleo de motor	n-hexadecano	Óleo de soja
pH					
2	33,01	62,77	61,09	10,23	48,85
4	32,61	65,31	63,59	12,45	54,03
6	27,64	90,09	88,72	16,14	62,14
8	26,53	95,63	91,16	20,98	66,22
10	26,66	94,54	92,05	21,11	66,66
12	27,08	93,24	91,68	18,89	60,57
Temperatura (°C)					
4	26,23	95,51	92,89	20,43	62,14
28	26,53	95,11	93,01	20,91	65,30
40	26,59	94,29	92,32	20,49	66,09
60	26,77	94,21	91,77	19,54	65,91
80	27,68	94,02	92,09	18,89	63,83
100	27,85	90,86	90,03	17,59	64,78
120	27,84	88,67	87,39	16,09	50,86
NaCl (%)					
0	26,23	94,98	93,05	20,78	65,93
2	26,29	94,25	92,56	21,12	66,01
4	26,41	94,25	92,88	20,34	65,45
6	26,38	93,81	91,65	20,89	65,91
8	26,54	92,95	90,34	21,84	62,83
10	27,49	90,87	89,78	19,94	61,42
12	27,58	90,01	88,98	21,91	60,89
Tempo (min)					
10	26,85	94,90	92,57	21,11	62,14
20	27,73	94,23	91,98	20,20	58,87
40	27,22	93,89	92,21	19,45	57,09
80	29,08	92,45	90,34	19,08	49,05
100	30,89	90,03	90,02	18,85	42,31
120	31,45	89,31	89,44	18,73	40,51

3.3 Avaliação da tensão superficial e CMC

O biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 exibiu excelente atividade surfactante. A tensão superficial da água foi reduzida de 71,44 para 28,77 mN/m (Figura 3) apresentando uma concentração micelar crítica (CMC) de 0,08%. A CMC após seis meses de armazenamento do biossurfactante isolado não foi alterada.

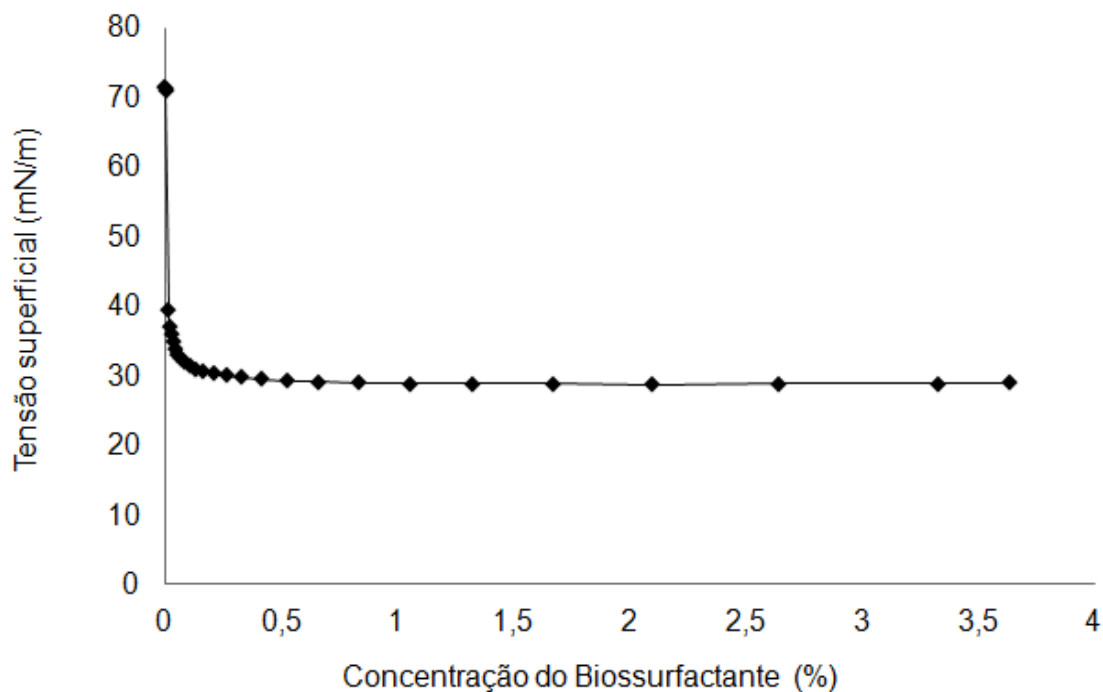


Figura 3 - Tensão superficial versus concentração do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 cultivada em meio suplementado com milhocina e óleo de soja residual de frituras (Fonte: SANTOS, 2012)

A CMC é um dos índices mais utilizados para a avaliação da atividade surfactante e pode ser definida como a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a menor tensão superficial (LIN, 1996) ou o mínimo de concentração do biossurfactante necessária para formar micelas (STAMPFLI; NERSTEN, 1995). Resultados melhores aos achados neste trabalho foram reportados por LUNA et al. (2011). De acordo com estes pesquisadores o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP0995 utilizando milhocina (9%) e resíduo de refinaria de óleo de soja (9%) reduziu a tensão superficial do meio para 25

mN/m. Rufino et al. (2011) descreveram o processo de produção do biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP0988, utilizando um meio de produção contendo óleo de soja de resíduo da refinaria e observaram uma CMC de 0,03% e uma redução da tensão superficial da água de 70 mN/m para 25,3 mN/m.

Valores de CMC maiores que os apresentados neste trabalho foram descritos para o biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. B3 (CMC de 110 mg/L), para o glicopídeo produzido por *Rhodococcus* spp. (CMC de 120 mg/L) e para a streptofactin produzidos por *Streptomyces tendae* (CMC de 36 mg/L) (RICHTER et al., 1998; MUTALIK et al., 2008; KHOPADE et al., 2012a). Valores da CMC iguais (0,08%) foram reportados por Sobrinho et al. (2008), com o biossurfactante produzidos por levedura *Candida sphaerica* UCP0995 em meio de cultivo suplementado com 5,0% de resíduo de refinaria e 2,5% de milhocina.

Os diferentes valores de CMC reportados nos vários trabalhos (RICHTER et al., 1998; MUTALIK et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; RUFINO et al., 2011; KHOPADE et al., 2012a) podem estar relacionados aos diferentes tipos de meios e condições de cultivo e isolados produtores.

3.4 Avaliação do índice de emulsificação

De acordo com Cooper e Goldenberg (1987) o índice de emulsificação é um importante parâmetro de avaliação do poder de um emulsificante. Os índices de emulsificação (IE_{24}) do biossurfactante bruto presente no líquido metabólico livre de células de *Streptomyces* sp. DPUA1566 utilizando diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais estão apresentados na Figura 4.

Através da análise dos resultados com os hidrocarbonetos utilizados é possível observar que todas as emulsões testadas apresentaram valores de $EI_{(24)}$ superiores a 30%. Os índices de emulsificação máximos (100%) foram observados frente ao óleo de motor residual e o óleo de motor. Os maiores valores do índice de emulsificação para os óleos vegetais foram obtidos a partir do óleo de pequi (65%) seguido do óleo de soja (60%), óleo de girassol (45%), óleo de milho (40%) e óleo de canola (35%). O menor índice de emulsificação foi observado para o n-hexadecano (30%).

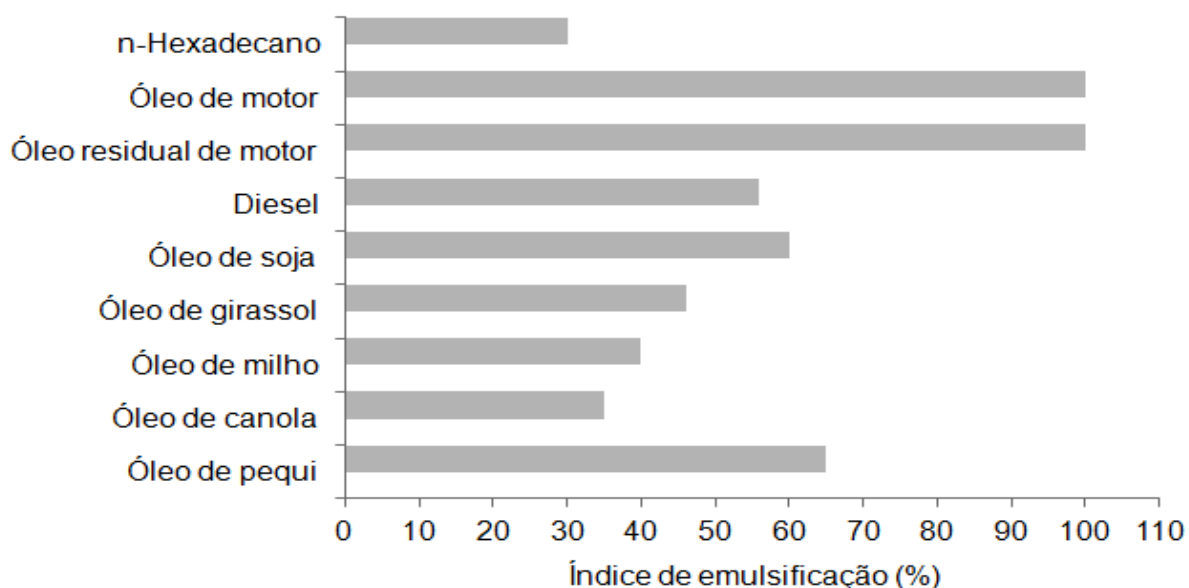


Figura 4 - Índice de emulsificação em diferentes óleos vegetais e hidrocarbonetos do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1566 (Fonte: SANTOS, 2012)

Quando comparados aos dados reportados por outros pesquisadores o biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 apresentou maiores índices de emulsificação frente aos hidrocarbonetos testados (LUNA et al., 2005; SILVA et al., 2010; SHAVANDI et al., 2011; KHOPADE et al., 2012a) e inferior valor aos achados de Costa et al. (2010) que reportaram um índice de emulsificação de 100% frente ao óleo de soja de um rhamnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1.

3.5 Caracterização Química do Biossurfactante

3.5.1 Cromatografia em camada delgada

A composição bioquímica do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 revelou a presença de 85% de proteína e 15% de lipídios evidenciando a natureza lipoproteica.

Estes resultados foram confirmados por cromatografia em camada delgada que mostrou bandas característica de aminoácidos e bandas características de lipídios após

contato com os reveladores específicos como a ninidrina e vapores de iodo, respectivamente. Neste ensaio foi revelada a ausência de carboidratos no biocomposto. Os resultados revelam que o biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 cultivada em meio suplementado com milhocina e óleo de soja residual de frituras após 96 horas de cultivo pertence ao grupo das lipoproteínas e foi denominado de BIOELAN.

Resultados similares foram reportados por Richter et al. (1998) quando descreveram um peptídeo, o streptofactin, produzidos por *Streptomyces tendae*. Um biossurfactante diferente dos achados neste trabalho foi produzido por *Streptomyces* sp. B3. Este biossurfactante foi identificado como um glicolípido (KHOPADE et al., 2012a). Os biossurfactantes lipoprotéicos produzidos por *Bacillus* sp. são os mais conhecidos e melhor caracterizados (surfactina, iturina, fengicina e liquenisina). Os biocompostos são peptídeos ligados a ácidos graxos e os aminoácidos estão dispostos em forma cíclica (MAIER, 2003).

3.5.2 Análises dos ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 em meio de cultivo suplementado com milhocina e óleo de soja residual de frituras, após 96 horas de cultivo estão apresentados na Figura 5, enquanto que os percentuais dos ácidos graxos estão apresentados na Tabela 4. O biossurfactante isolado produzido pelo *Streptomyces* sp. DPUA1566 apresentou em sua composição 94,1% de ácidos graxos constituídos de 18 átomos de carbono e 5,5% de ácidos graxos constituídos de 16 átomos de carbono. Os demais ácidos graxos (C 14:0 – mirístico; C 12:0 – láurico; C 20:0 - araquídico e C 20:1- eicosenóico) perfizeram um percentual de 0,4%. Como pode ser observado, os resultados indicaram valores mais elevados nos ácidos graxos insaturados de cadeia longa como oléico (C:18-1) e linoléico (C:18-2), porém menor teor no ácido graxo saturados de cadeia longa como palmítico (C:16-0) e esteárico (C:18-0).

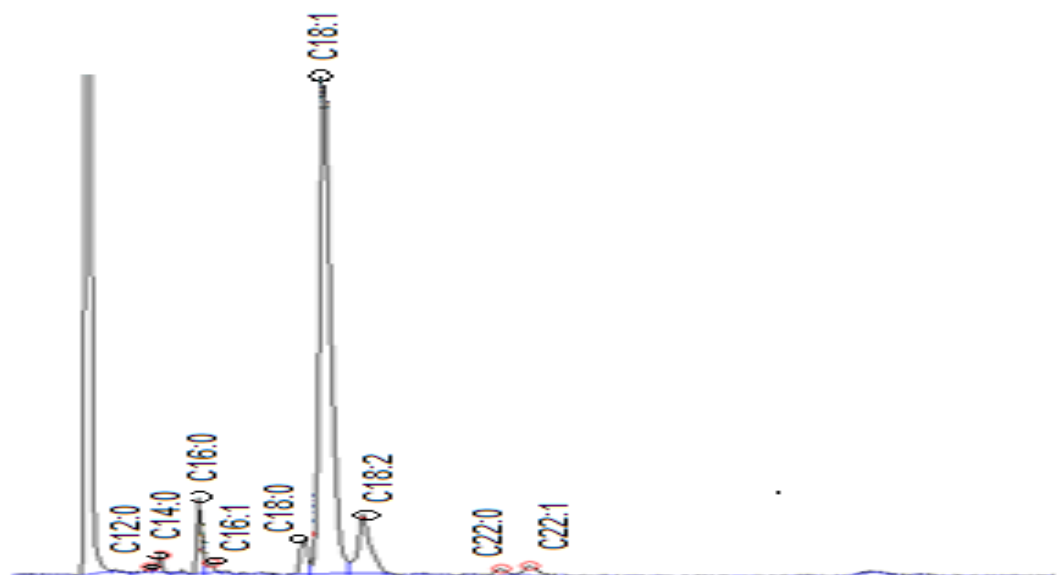


Figura 5. Cromatograma da parte lipídica do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 cultivada em meio suplementado com milhocina e óleo de soja residual de frituras (Fonte: SANTOS, 2012)

Tabela 4. Composição em ácidos graxos do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566

Ácidos graxos	Total (%)
C12:0 - láurico	<0,1
C14:0 - mirfístico	<0,1
C16:0 - palmítico	4,1
C16:1- palmitoléico	1,4
C18:0 - esteárico	4,1
C18:1 - oléico	80
C18:2 - linoléico	10
C20:0 - araquídico	<0,1
C20:1 - eicosenóico	<0,1

Este perfil difere do biossurfactante surfactina, um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidróxi, que pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (KOWALL et al., 1998; LANG, 2002). O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3 hidróxi-13-metil-tetradecanóico ligado por ligação lactona (KOWALL et al., 1998; PEYPOUX et al., 1999; LANG, 2002).

3.5.3 Espectrometria no Infravermelho

A análise de FT-IR apresentada na Figura 6 mostrou a presença de um estiramento em 3300 cm^{-1} de OH (I). Os estiramentos em 2960 e 2850 cm^{-1} sugerem a presença de CH (II e III) característico de hidrocarbonetos. Há um estiramento intenso em 1670 cm^{-1} indicando a presença de C=O de grupos cetônicos (IV). Em 1558 cm^{-1} o estiramento é característicos do grupamento amida (V). As bandas 1080 cm^{-1} são características de ácidos carboxílicos (VI). No espectro do lipopeptídio apresentado na Figura 7 pode ser observar que há um estiramento intenso característico de ligação peptídica em 1530 cm^{-1} (G) e várias ligações CONH em 3430 cm^{-1} (A) pelo aspecto agudo da banda, além de uma cadeia de hidrocarbonetos em 3000 a 2800 cm^{-1} (BCD) semelhante ao espectro do biossurfactante isolado produzido pelo *Streptomyces* sp. DPUA1566.



Figura 6. Espectro FT-IR do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 (Fonte: SANTOS, 2012)

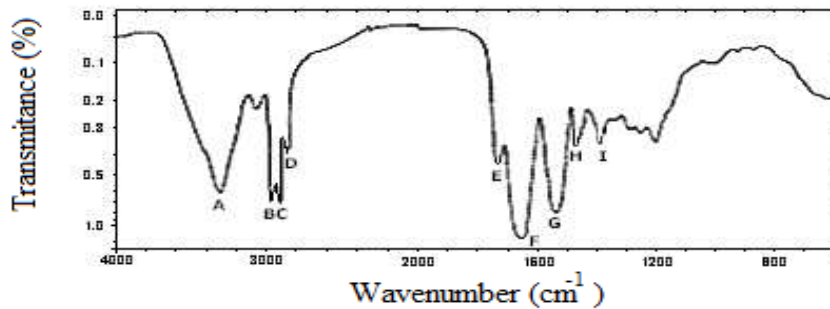
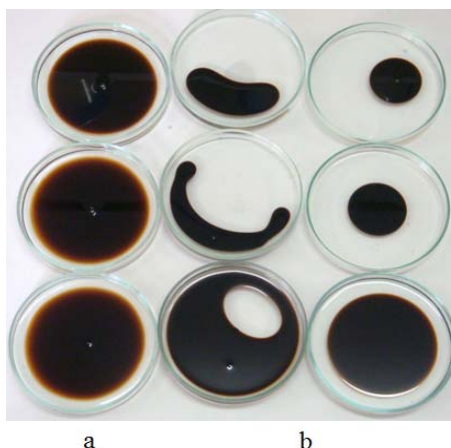


Figura 7. Figura ilustrativa do espectro de Infravermelho do lipopeptídeo produzido por *Bacillus licheniformes* JF-2 (Fonte: JENNY et al., 1991)

Os resultados do espectro de infravermelho do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 quando comparados ao espectro do lipopeptídeo obtidos por Jenny et al. (1991) observa-se várias bandas em regiões semelhantes e corroboram com os dados da Figura 6.

3.5.4 Dispersão e agregação de óleo

A atividade superficial do biossurfactante isolado por *Streptomyces* sp. DPUA1566 e do extrato depois de retirada da parte lipídica está ilustrada na Figura 8.



Fonte: SANTOS(2012)

Figura 8 – Figura ilustrativa da dispersão e agregação do óleo residual de motor pela ação do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566: (a) óleo não disperso; (b) dispersão e agregação do óleo residual de motor

A Figura 8 “a” ilustra que não ocorreu a dispersão e agregação do óleo na superfície da água após aplicação da solução do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 depois de extraída a parte lipídica, como também da parte lipídica. Observa-se que ocorre o inverso quando a solução do biossurfactante isolado entra em contato com a superfície do óleo (Figura 8 “b”). A dispersão e a agregação do óleo são verificadas, visualmente pela redução do diâmetro do óleo na superfície da água. Pode-se inferir que a propriedade de atividade superficial do biossurfactante isolada foi suprimida, revelando que a parte lipídica quando associada à parte protéica a atividade superficial é mantida, demonstrando que o surfactante presente pertence ao grupo dos biossurfactantes lipoproteicos.

Alguns outros métodos qualitativos são usados para detectar a atividade superficial do biossurfactante. Dentre esses métodos, o mais conhecido é a técnica qualitativa do colapso da gota que avalia a desestabilização de gotas de óleos por surfactantes (WALTER et al., 2008). Porém, a dispersão de óleos tem sido pouco reportada por pesquisadores (MORIKAWA et al., 1993; GANDHIMATHI et al., 2009).

4 CONCLUSÃO

A linhagem de *Streptomyces* sp DPUA1566 isolada de líquens da Região Amazônica apresenta potencial como micro-organismo produtor de biocompostos com atividade surfactante e emulsificante.

O biossurfactante bruto presente no líquido metabólico livre de células manteve-se estável quando submetidos a condições extrema de temperatura, pH e diferentes concentrações de NaCl. O biopolímero manteve-se estável as condições de armazenamento. Dentre as variáveis utilizadas a concentração de milhocina e de óleo de soja residual de frituras apresentaram efeito significativo do ponto de vista estatístico na produção do biossurfatante.

O BIOELAN produzido pela bactéria *Streptomyces* sp DPUA1566 representa um novo surfactante pertencente ao grupo das lipoproteínas, apresentando propriedades potenciais para aplicações pelas indústrias farmacêuticas, cosméticos, alimentos, petróleo e ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, R. F. S. et al. Produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* utilizando manipueira como substrato. In: In: 1 Workshop Meio Ambiente, Ciências e Tecnologia - De mãos dadas para o futuro, Recife. **Anais**. 2006.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Potencial commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508. 2000.

BERGEY, MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Available from: <http://www.bergeys.org>. 2006. **The Prokaryotes** - A Handbook on the Biology of Bacteria Third Edition Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 2006. p. 605-622.

BHARALI, P. et al. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 682-690. 2011.

BLIGH E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry**, v. 37, p. 911-917. 1959.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as Emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and science. A - Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52. 1999.

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

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

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 262-266. 2004.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from to *Bacillus species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229. 1987.

COOPER, D. G. et al. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412. 1981.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE. M.; CONTIERO, J. Produção de biotenssoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34-38. 2008.

COSTA, S. G. V. A. O. et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1511-1516. 2010.

CYBULSKI, Z. et al. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonadacea* and *Bacillacea* strains. **Spill Science and Technology Bull**, v. 8, p. 503-507. 2003.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 246-2531. 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 499-504. 2009.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Review**, v. 61, p. 47-64. 1997.

FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951-1957. 2011.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099. 2008.

FRANZETTI, A. et al. Cultural factors affecting biosurfactant production by *Gordonia* sp. BS29. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 943-947. 2009.

GANDHIMATHI, R. et al. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 825-835. 2009.

GEIN, S. V. et al. In vitro cytokine stimulation assay for glycolipid biosurfactant from *Rhodococcus ruber*: role of monocyte adhesion. **Cytotechnology**, v. 63, n. 6, p. 559-566. 2011.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory of Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

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

JAIN, R. M. MODY, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2320-2326. 2012.

JAVAHERI, M. et al. Anaerobic production of a bisurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Journal of Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 698-700. 1985.

JENNY, K., KAPPELI, O.; FIECHTER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformes*: structural analysis characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 5-13. 1991.

KONISHI, M. et al. Biosurfactant-producing yeast isolated from *Calyptogena soyoae* (deep-sea cold-seep clam) in the deep sea. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 2, p. 169-175. 2010.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311-318. 2012a.

KHOPADE, A. et al. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. **Desalination**, v. 285, p. 198-204. 2012b.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256. 2009.

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

KOWALL, M. et al. and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 204, n. 1, p.1-8. 1998.

LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion I Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12-20. 2002.

LIN, S. Particle-bound PAH in ambient air. **Journal of Chemical Techonology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120. 1996.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. M. R.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP0995. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1527-1534. 2011.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A. New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP1002: Characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793. 2009.

LUNA, J. M. et al. Produção de Biossurfactantes por *Candiada glabrata* utilizando óleo de algodão como substrato. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005, Recife. **Anais XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2005.

MAIER, R. M. Biosurfactant: evolution and diversity in bacteria. **Advence Applied of Microbiology**, v. 52, p. 101-121. 2003.

MORIKAWA, M. et al. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS 38. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 6459-6466. 1993.

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

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **International Journal of Environment and Pollution**, v. 7, p. 362-366. 2004.

MULLIGAN, C.; YONG, N. R.; GIBBS, F. B. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engeneering Geology**, v. 60, p. 371-380. 2001.

MUTALIK, S. R. et al. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7875-7880. 2008.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. C.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2nd ed., Editora da Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brazil, 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593–600. 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresourcer Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341. 2006.

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

PARRA, J. L. et al. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 66, n. 1, p. 141-145.1989.

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

PRIDHAM, T. G. et al. A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, p. 947-953, 1957.

RICHTER, M. et al. Streptofactin, a novel biosurfactant with aerial mycelium inducing activity from *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 165-171. 1998.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 135-142. 2006.

ROLDÁN-CARRILLO, T. et al. Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 384-389. 2011.

RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5. 2011.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 734-741. 2007.

SARAVANAKUMARI, P.; MANI, K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. **Bioresourcer Technology**, v. 101, p. 8851-8854. 2010.

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. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 400-406. 2006.

SARUBBO, L. A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59-67. 2001.

SHAVANDI, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 477-482. 2011.

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183. 2010.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917. 2008.

STATISTICA - STATSOFT Inc., (Data Analysis Software Systems) Version 8.0 (2008).

STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. **Food Chemistry**, v. 52, p. 353-360. 1995.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. B. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3366-3372. 2011.

VAZ, D. A. et al. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 167-174. 2012.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347. 2004.

WALTER, V. et al. Biosurfactants, capítulo **Screening concepts for isolation of biosurfactant producing microorganisms**. Landes Bioscience, 2008. p. 1-14.

Capítulo 4

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BIOSSURFACTANTE BIOELAN
PRODUZIDO POR *Streptomyces* SP. DPUA1566 FRENTE A
Staphylococcus aureus MULTIRRESISTENTE ISOLADOS DE MASTITE
BUBALINA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BIOSURFACTANTE BIOELAN
PRODUZIDO POR *Streptomyces* SP. DPUA1566 FRENTE A
Staphylococcus aureus MULTIRRESISTENTE ISOLADOS DE MASTITE
BUBALINA

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A BIOSURFACTANT BIOELAN
PRODUCED BY *STREPTOMYCES* SP. DPUA1566 AGAINST
MULTIRESISTANT *Staphylococcus aureus* ISOLATES OF BUFFALOES
MASTITIS

Eduardo Francisco dos Santos¹, Leonie Asfora Sarubbo² e Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife-Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas bioativas de origem microbiológica com crescente interesse científico, terapêutico e biotecnológico. A atividade antimicrobiana do biossurfactante Bioelan produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi avaliada frente à *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de mastite bubalina. A estabilidade do *Streptomyces* sp. DPUA1566 em produzir biossurfactante foi estudada durante 960 horas. O teste de atividade antimicrobiana do biossurfactante foi realizado pelo método de difusão em discos e em poços. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram realizadas pelo método de microdiluição. Os micro-organismos teste foram *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis* e 20 estirpes de *S. aureus* multirresistentes isoladas de mastites. O isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1566 apresentou estabilidade de produção de biossurfactante durante 960 horas de produção. O biossurfactante Bioelan reduziu a tensão superficial do meio de 52,38 para 26,24 mN/m e o rendimento foi de 3,11 g/L. O biossurfactante Bioelan na concentração de 30 mg/mL apresentou atividade antimicrobiana frente *S. aureus*, *P. aeruginosa* e ao *E. faecalis*, porém *B. subtilis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* foram resistentes. O biossurfactante Bioelan apresentou CIM variando de 15 mg/mL a 60mg/mL frente aos isolados de mastite bubalina. A CMB do biossurfactante frente a dois dos isolados multirresistentes de mastite bubalina foi de 30 mg/mL a 60 mg/mL. O biossurfactante Bioelan produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 apresenta potencial atividade antimicrobiana contra as estirpes de *S. aureus* multirresistentes isolados de mastite bubalina e representa uma alternativa promissora na produção de um biocomposto terapêutico, com potencial para aplicação na indústria farmacêutica e de produtos veterinários.

Palavras-chave: Mastite, Biossurfactante, *Staphylococcus* Multirresistentes, Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Biosurfactants are bioactive molecules of origin microbiology with increasing scientific, therapeutic and biotechnological interests. Antimicrobial activity of biosurfactant Bioelan by *Streptomyces* sp. DPUA1566 was determined against multiresistant *Staphylococcus aureus* isolated from buffaloes mastitis. The stability strain of *Streptomyces* sp. DPUA1566 to biosurfactant production was studied for 960 hours. Antimicrobial activity of the biosurfactant Bioelan was performed by disc and wells diffusion methods. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were performed by broth microdilution methods. The test micro-organisms are *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *B. subtilis* and *E. faecalis* and 20 strains multiresistant *S. aureus* isolated from mastitis. The *Streptomyces* sp. DPUA 1566 was stable to biosurfactant production, for 10 cycles of 96 hours. The isolated biosurfactant showed a yield of 3.11 g/L. The biosurfactant Bioelan reduced medium surface tension from 52.38 to 26.24 mN/m. The biosurfactant Bioelan, in concentration of 30 mg/mL, showed antimicrobial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. faecalis*. However, *E. coli*, *B. subtilis* and *K. pneumonia* were resistant. The MIC of biosurfactant Bioelan ranging from 15 mg/mL to 60 mg/mL against mastitis buffaloes isolates. MBC were obtained from 30 mg/mL for two of the multiresistant isolates of buffalo mastitis. The results demonstrated the spectrum antimicrobial activity of the biosurfactant Bioelan by *Streptomyces* sp. DPUA1566 against multiresistant *S. aureus* tested, is an alternative for producing a therapeutic biomolecule, with potential for application in pharmaceutical and veterinary industrie.

Key Words: Buffaloes, Mastitis, Biosurfactant, *Streptomyces*, multiresistant, antimicrobial activity

1 INTRODUÇÃO

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária e representa um sério problema para a pecuária leiteira por promover perdas econômicas devido à redução na produção de leite, custos do leite descartado e gastos com tratamentos (HAMZA; CHOUDHURI, 1994; MACHADO et al., 1998). De acordo com Medeiros et al. (2011) os fatores de risco para ocorrência de mastite subclínica foram relacionados às características de manejo inadequado da ordenha. A análise multivariada considerando o microbiológico como variável dependente constatou-se que aquelas propriedades que realizavam limpeza manual do equipamento de ordenha apresentavam um risco de infecção de 1,85 (I.C. 1,32-3,64) maior do que aquelas propriedades que realizavam esta limpeza de forma mecânica (MEDEIROS et al., 2011).

Na Índia, RASHID (2001) ao submeter amostras de micro-organismos isolados de mastites subclínicas ao exame microbiológico para pesquisa de quadros infecciosos, observou que o agente mais comum foi *Streptococcus pyogenes* (35,46%) seguido por *Staphylococcus aureus* (33,99%), *Escherichia coli* (27,09%), *Pseudomonas* spp. (1,97%) e *Corynebacterium pyogenes* (1,48%). Cunha et al. (2006) verificaram que a bactéria mais frequente nos casos de mastite clínica (33,34%) e subclínica (50,62%) de búfalas no rebanho do Rio grande do Norte foi o *Staphylococcus* spp., onde 20% das amostras foram coagulase positiva.

O uso indiscriminado de antibióticos com dosagens inadequadas no tratamento de mastite subclínica bubalina favorece o desenvolvimento de cepas patogênicas multirresistentes, cuja ocorrência na glândula mamária vem sendo observada (COSTA et al., 2006). Na Índia, Kumar et al. (2011) reportaram padrões de gene de virulência de 111 espécies de *S. aureus* resistentes a antibióticos, isolados de mastites bubalina.

O impacto da resistência de micro-organismos aos antibióticos tem movimentado pesquisadores de todo mundo na perspectiva de controlar estes organismos. Dentre as soluções está o uso mais racional dos antibióticos no controle da mastite e a descoberta de novos fármacos (ERSKINE et al., 1993; OLIVEIRA, 2004). Nesta perspectiva, muitos biossurfactantes foram submetidos a diversos estudos na

descoberta de novos antibióticos (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004, KIRAN et al., 2009; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2011; KHOPADE et al., 2012).

Os biossurfactantes são moléculas anfífilas produzidas por micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos e são classificados em lipopeptídios, glicolipídios, lipídios neutros, ácidos graxos, fosfolipídios, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (LANG, 2002; YOUSSEF et al., 2004).

Os biossurfactantes produzidos por *Bacillus licheniformis* (lichenisina A), *Bacillus subtilis* (surfactina) e *Lactococcus lactis* (xilolipídios) apresentaram atividades antimicrobianas frente à *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (NITSCHKE et al., 2004; SARAVANAKUMARI; MANI, 2010; CHEN et al., 2012).

A atividade antimicrobiana de biossurfactantes produzido por *Candida lipolytica* e *Aspergillus ustus* contra *Streptococcus agalactiae*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *Candida albicans*, *S. hemolítico*, *Micrococcus luteus*, *Eterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* foram reportadas (KIRAN et al., 2009; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2011). O biossurfactante produzido pelo *Streptomyces* sp. B3 apresentou potencial atividade antimicrobiana frente a diversas bactérias patogênicas como *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (KHOPADE et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do biossurfactante Bioelan produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 a partir de resíduos de baixo custo frente à *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de mastite bubalina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos testes e meios de manutenção

O *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi isolado a partir de líquens da Região Amazônica, pertencente à Coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA), mantido em agar ISP-2 (PRIDHAM et al, 1957) modificado pela retirada da glicose (extrato de levedura 0,4%

v/v, extrato de malte de 1% v/v; agar 2% v/v), incubados em estufa bacteriológica a 30°C, durante 15 dias. O *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi conservado como cultura estoque em criotubos utilizando glicerol 10% (v/v) e incubados em freezer a -18°C.

As bactérias utilizadas na atividade antimicrobiana do biossurfactante foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057) como recomendado pelo National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003) e as estirpes de *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de mastites subclínica de búfalas da raça Murrah, cedidas pelo Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Sete isolados foram procedentes de rebanhos do Estado de Pernambuco e 13 isolados do Estado de Alagoas. Os micro-organismos teste foram mantidos e ativados em caldo nutriente, esterilizados em autoclave a 121°C/1 atm de pressão, durante 20 minutos. Cada micro-organismo teste foi inoculado em tubos de ensaio contendo o caldo nutriente e incubado em estufa bacteriológica a temperatura de 37°C durante 24 horas.

2.2. Produção do biossurfactante Bioelan

O inóculo para produção do biossurfactante Bioelan foi preparado utilizando frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio líquido ISP-2 (extrato de levedura 0,4% v/v, extrato de malte 1% v/v, pH 7,0) e adicionados fragmentos de 6,0 mm de diâmetro, retirados da área central das culturas do *Streptomyces* sp. DPUA1566 crescidos em meio agar ISP-2, a 30°C, durante 15 dias.

Os Erlenmeyer foram incubados em agitador orbital (B. BRAUN) a 150 rpm, 28°C por 48 horas. Alíquotas do fermentado (5 mL) foram transferidos para tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL do meio líquido ISP-2 e agitados em vórtex durante 10 segundos para atingir a concentração de 10⁸UFC/mL, o que correspondeu a uma solução padrão de McFarland a 0,5, ou seja, um valor de absorvância igual a 0,1 a 600nm. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C/1 atm de pressão, durante 20 minutos.

A produção do biossurfactante Bioelan foi conduzida em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL do meio de produção constendo milhocina (3% v/v) e óleo de soja residual de frituras (3% v/v). O óleo de soja residual de frituras (coletados de estabelecimento comercial) foi utilizado como fonte de carbono e a milhocina (resíduo industrial do processamento de milho a partir da fábrica da Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, Brasil) como fonte de nitrogênio e minerais. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com uma solução de NaOH a 1,0 M, esterilizado em autoclave a 121°C/1 atm de pressão, durante 20 minutos. Em seguida foram acrescentados 4% da suspensão do inóculo do *Streptomyces* DPUA1566 e incubados em agitador orbital a 150 rpm, 28°C, durante 96 horas.

2.3 Extração do biossurfactante Bioelan

Após 96 horas de cultivo do *Streptomyces* sp. DPUA1566 o líquido metabólico foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos, filtrado (papel de filtro, marca J. LABOR) a vácuo para retirada das células e submetidos ao processo de extração.

O pH do líquido metabólico livre de células foi ajustado para 2,0 com uma solução de HCl a 6,0 M.

Em seguida, iguais volumes de clorofórmio/metanol (2:1) e do líquido metabólico livre de células foram adicionados em funil de separação de 500 mL, sendo a mistura agitada de forma vigorosa por 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases (JAVAHERI et al., 1985). A fase orgânica contendo o biossurfactante Bioelan foi removida e a operação repetida por mais duas vezes.

O produto obtido foi concentrado por centrifugação a 3000 x g por 5 min. O *pellet* formado foi removido e suspenso em água Milli-q e ajustado o pH para 7,0 com uma solução 1M de NaOH.

A suspensão foi colocada em placas de Petri esterilizadas e evaporada a 37°C em estufa de secagem (Modelo QUIMIS), durante 12 horas, esfriadas em dessecador e pesada até peso constante para determinar o rendimento em g/L. O produto obtido foi considerado como biossurfactante isolado.

2.4 Avaliação da estabilidade do *Streptomyces* sp. DPUA1566 na produção do biossurfactante Bioelan

Baseado nos processos industriais um cultivo foi realizado para verificar a estabilidade do *Streptomyces* sp. DPUA1566 em produzir biossurfactante ao longo do tempo. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL do meio de produção. O inóculo e o meio de produção utilizado estão descrito no item 2.2. Os frascos foram inoculados com 2% do inóculo a 10^8 UFC/mL e incubados a 28°C em agitador orbital a 150 rpm, durante 96 horas. Após cada período de 96 horas de cultivo foi retirada e transferida uma alíquota de 5% do líquido metabólico fermentado contendo células do *Streptomyces* sp. DPUA1566 para outro frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL do meio esterilizado e incubado nas mesmas condições. Esta operação foi repetida por dez vezes perfazendo um total de 960 horas. A estabilidade do micro-organismo em produzir biossurfactante foi verificada pelas determinações de biomassa, pH, rendimentos em biossurfactante isolado, tensão superficial e índice de emulsificação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5 Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi realizada por gravimetria utilizando 10 mL do líquido metabólico após o período de fermentação e centrifugados a 10.000 x g durante 20 min. O *pellet* celular foi seco em estufa a 105°C por 24 horas, mantidos em desecador até peso constante.

2.6 Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial do biossurfactante Bioelan produzidos por *Streptomyces* sp. DPUA1566 presente no líquido metabólico livre de células foi realizada utilizando tensiômetro Sigma 700 (KSV Instruments Ltd., Finlândia) pelo método do anel Du Nouy à temperatura ambiente. O tensiômetro foi calibrado medindo-se a tensão superficial da água Milli-q (72 mN/m) (COOPER et al., 1981).

2.7 Determinação do índice de emulsificação (IE₂₄)

O índice de emulsificação (IE₂₄) do líquido metabólico livre de células foi determinado utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg et al. (1987). O líquido metabólico livre de células foi misturado em tubos de ensaio a compostos hidrofóbicos na proporção de 1:1 e homogeneizados em Vórtex, durante dois minutos. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura de 28°C, durante 24 horas. Em seguida foram efetuadas medidas da altura da Camada Emulsificada (CE) e da Altura Total (AT) dos componentes no tubo de ensaio. O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: $IE_{24} = (CE/AT) \times 100$. Os compostos utilizados no teste descrito acima foram os seguintes hidrocarbonetos: n-hexadecano, óleo de motor, óleo de motor residual e o óleo vegetal de soja (*Glycine Max* L.).

2.8 Atividade antimicrobiana

2.8.1 Teste em difusão em discos e em poços

O teste de atividade antimicrobiana do biossurfactante Bioelan foi realizado pelo método de difusão em discos conforme preconizado pela National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003).

Discos de seis mm de diâmetro receberam 20 µL da solução do biossurfactante Bioellan nas concentrações de 60 mg/mL, 30 mg/mL, 15 mg/mL, 7,5 mg/mL, 3,75 mg/mL, 1,85 mg/mL e 0,92 mg/mL e foi avaliado frente aos micro-organismos teste *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 29665), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (6057).

O inóculo foi padronizado (0,5 na escala de Mac Farland), o que corresponde a 10⁸ UFC/mL. Como controle negativo foi usado a água Milli-q (8) e positivo a clorexidina 0,12%.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 37°C, durante 24 horas. A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada pela observação do aparecimento de halo de inibição, medidos em milímetros.

2.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi realizada de acordo com o método descrito pelo National Comité Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2003). As estirpes de *Staphylococcus aureus* multirresistentes isoladas de mastite bubalina subclínica foram cultivados em tubos de ensaio (10 mL) contendo o meio caldo Tryptic Soy Broth (TSB) e incubados a 37°C, durante 24 horas. Em seguida, o inóculo foi padronizado (0,5 na escala McFarland) para concentração final de 10⁵ UFC/mL.

O potencial antimicrobiano do biossurfactante Bioelan foi testado em microplacas de 96 poços em diferentes concentrações (60 mg/mL, 30 mg/mL, 15 mg/mL, 7,5 mg/mL, 3,75 mg/mL, 1,85 mg/mL e 0,92 mg/mL). Em cada poço foram adicionados 100 µl do caldo Muller-Hinton, 10 µl de cada inóculo e 90 µl de cada concentração do biossurfactante, incubadas a 37°C por 24 horas e realizada a leitura em leitor de microplacas a 595 nm.

Após o período de incubação, 20 µL de resazurin (Sigma®, Steiheim, Alemanha) foram acrescentados aos poços e a placa incubada em estufa bacteriológica a 37°C por mais duas horas. O resazurin é um indicador de óxido-redução, utilizado para revelar alteração de pH no meio determinado pelo crescimento bacteriano (MONTEJANO et al., 2005).

Este sistema revelador permite a leitura das microplacas em pouco tempo. Os poços que adquirem uma coloração rosada indicam a reação química de oxidação-redução da resazurin em resorufurina sendo interpretada como presença de células viáveis, enquanto que nos poços onde não há mudança na coloração do corante interpreta-se como ausência de células viáveis, indicando inibição do crescimento celular pelo extrato.

2.8.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada frente a todos os *Staphylococcus aureus* multirresistente isolados de mastite bubalina. Para a confirmação da CBM foram transferidas alíquotas dos poços com auxílio de uma alça de platina para superfície de Agar Muller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas. O efeito bactericida (CBM) foi considerado como a menor concentração capaz de inibir

completamente o crescimento bacteriano, mesmo após a retirada do agente antimicrobiano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da estabilidade do *Streptomyces* sp. DPUA1566 na produção do biossurfactante Bioelan

A estabilidade de produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi avaliada. Nas Figuras 1 e 2, estão apresentados o perfil de crescimento microbiano, produção de biossurfactante, pH, tensão superficial e índice de emulsificação, após 960 horas de cultivo. Todos os parâmetros estudados indicam um perfil de estabilidade do *Streptomyces* sp. DPUA1566 na produção de biossurfactante durante todos os 10 ciclos de produção.

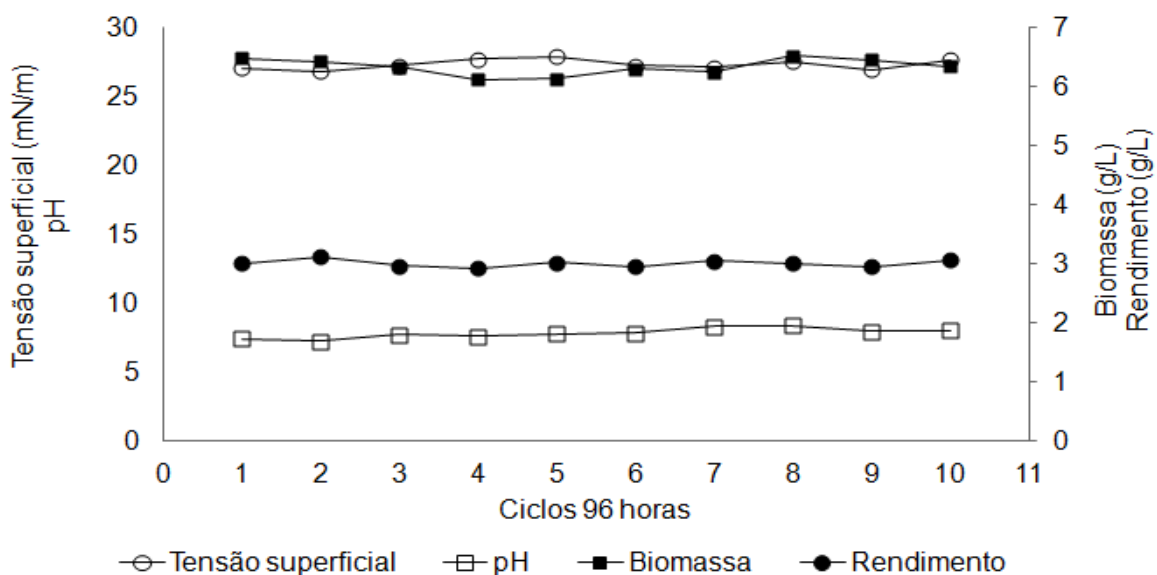


Figura 1 - Valores da tensão superficial, pH, biomassa e rendimento de produção do biossurfactante Bioelan por *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 960 horas de cultivo

O melhor rendimento em biossurfactante isolado de 3,12 g/L foi observado após o segundo ciclo de produção enquanto que o menor valor (2,93 g/L) foi obtido após o

sétimo ciclo de produção (variação de 6,1%). Resultados melhores foram reportados por Sobrinho et al. (2008) que observaram um rendimento de 4,5 g/L de biosurfactante produzidos pela levedura *Candida sphaerica* UCP0995 a partir de água destilada, suplementado com 5,0% de resíduos de refinaria e 2,5% de milhocina, como substratos, após 144 horas.

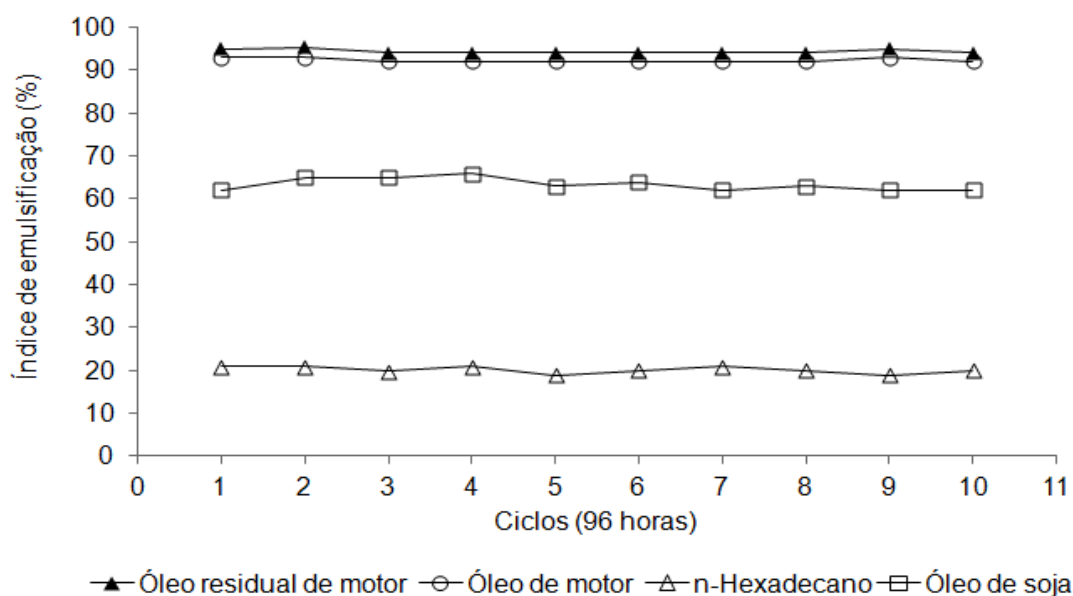


Figura 2 - Valores do índice de emulsificação do biosurfactante Bioelan presente no líquido metabólico livre de células de *Streptomyces* sp. DPUA1566 após 960 horas de cultivo

Os valores de pH durante todo o processo de produção variaram de 7,23 para 8,38 (variação de 13,7%) corroborando com os valores obtidos durante a curva de crescimento. A biomassa durante o primeiro ciclo de produção alcançou o menor valor mensurado (5,48g/L). A maior concentração de massa seca (6,52 g/L) ocorreu durante o oitavo ciclo de produção (variação de 15,9%). Os valores da tensão superficial do biosurfactante variaram de 27,88 mN/m a 26,77 mN/m. Uma variação percentual de 3,9%. O índice de emulsificação se manteve constante durante todo o processo quando foi utilizado o óleo de motor residual (94 a 95%), óleo de motor (92 a 93%), n-hexadecano (19-21%) e o óleo de soja (63-65%).

De acordo com os resultados apresentados, o isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1566 se mostrou estável na produção biossurfactante em 960 horas de crescimento. Os resultados obtidos nesta fase da pesquisa são promissores quando comparados com processos de produção de biossurfactante realizados por outros pesquisadores (SILVA et al., 2010; FARIA et al., 2011; CHEN et al., 2012; JAIN, et al., 2012; KHOPADE et al., 2012; VAZ et al., 2012).

3.2 Atividade antimicrobiana do biossurfactante Bioelan

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana do biossurfactante Bioelan através do teste de difusão em discos mostraram atividade antimicrobiana nas diferentes concentrações testada. Nas concentrações de 60 mg/mL e 30 mg/mL (g/v) foram observados halos de inibição de 17 mm e 13 mm para *Staphylococcus aureus*, 15 mm e 12 mm para *Pseudomonas aeruginosa* e 18 mm e 16 mm para *Enterococcus faecalis* (Figura 3).

Foi observado que os micro-organismos *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foram resistentes a todas as concentrações do biossurfactante Bioelan observadas pela ausência de halos de inibição.

Os halos de inibição do crescimento bacteriano promovidos pela ação do biossurfactante Bioelan produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 foram superiores aos achados por Saravanakumari e Mani (2010) que reportaram que os biossurfactantes purificados, a partir de *Bacillus licheniformis* (lichenisina A) e *Lactococcus lactis* (xilolipídios), mostraram atividades antimicrobianas contra várias linhagens patogênicas de *Escherichia coli* (CdR, NxR, GR, CR, CzR, KR, NaR, AR, PR, AkS, ES) e de *Staphylococcus aureus* (CdS, KR, CzR, PR, GR, AR, CS, NxR, NaR, MR, AkS, ES, TeS, TiS) resistentes à metilina verificados pela formação de halos de inibição que variaram de 13,1-14,6 mm e 12,6-13,8 mm, respectivamente.

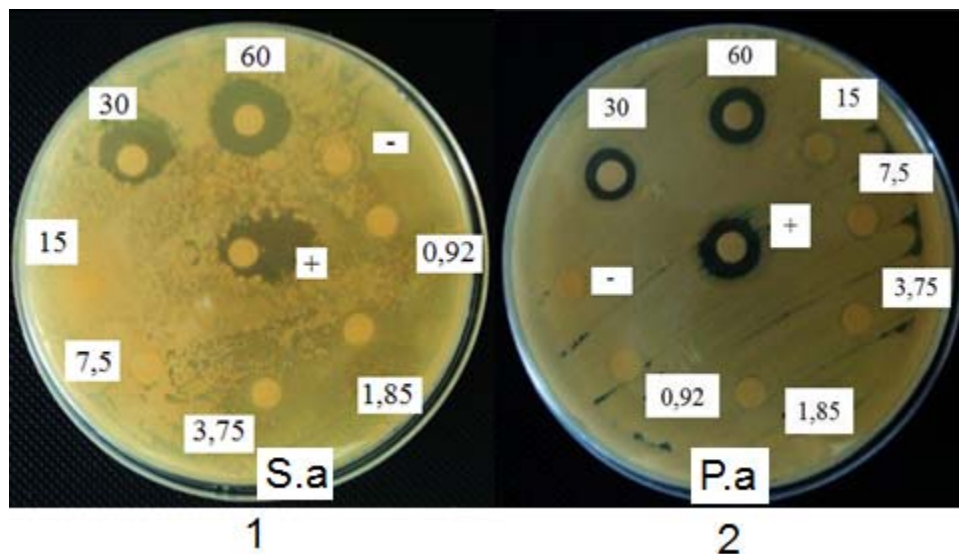


Figura 3 - Figura ilustrativa do teste de atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (1) e a *Pseudomonas aeruginosa* (2) utilizando o biossurfactante Bioelan através da técnica de difusão em discos (Fonte: SANTOS, 2012)

A avaliação da atividade antimicrobiana de lipopeptídios produzido por *Bacillus subtilis* foi realizada frente à *Enterococcus faecalis* (11 linhagens), *Staphylococcus aureus* (6 linhagens), *Pseudomonas aeruginosa* (7 linhagens) e *Escherichia coli* IC18. Todas as linhagens foram sensíveis ao biossurfactante. Os halos de inibição variaram de 9 mm a 28 mm de diâmetro. Estes resultados demonstraram que os lipopeptídios têm um amplo espectro de ação, incluindo micro-organismos multidroga-resistentes (FERNANDES et al., 2007) e corroboram com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Muitos biossurfactantes produzidos por bactérias pertencentes às famílias *Pseudomonaceae* e *Bacillaceae* possuem potente atividade antimicrobiana e foram submetidos a diversos estudos na descoberta de novos antibióticos (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; COSTA et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; SIDDHARTHA et al., 2010; SILVA et al., 2010; FARIA et al., 2011; CHEN et al., 2012).

3.3 Teste da CMB e CIM

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pela ausência de crescimento do micro-organismo após o contato com as diferentes concentrações do biossurfactante Bioelan (Figura 4). O comportamento do biossurfactante Bioelan sobre o

crescimento dos isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistente está ilustrado na Figura 5.

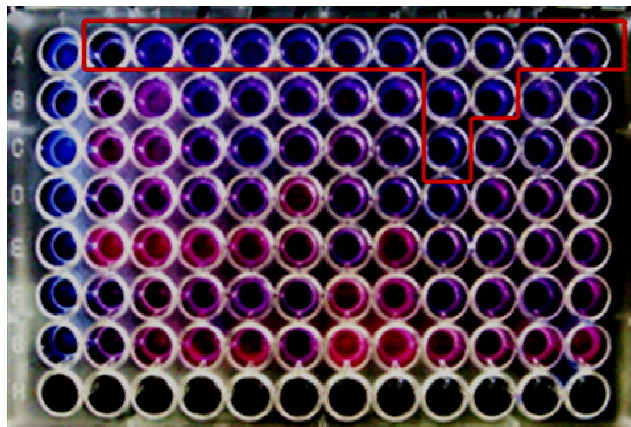


Figura 4 – Figura ilustrativa da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do biossurfactante Bioelan de *Streptomyces* sp. DPUA1566 após aplicação do corante resazurin frente as estirpes de *Staphylococcus aureus* multirresistentes isoladas de mastite bubalina subclínica. A concentração inibitória mínima (CIM) corresponde ao último poço azul da linha no sentido de cima para baixo (Fonte: SANTOS, 2012)

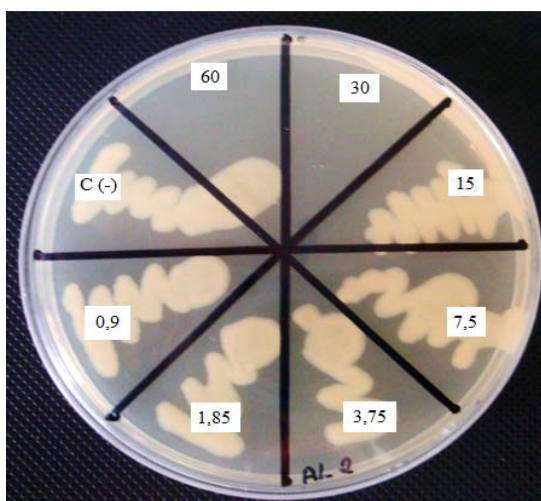


Figura 5 – Figura ilustrativa da inibição do crescimento microbiano frente ao *Staphylococcus* coagulase positiva utilizando o biossurfactante Bioelan após teste de concentração inibitória mínima (CIM) (Fonte: SANTOS, 2012)

Observa-se que a concentração inibitória mínima (CIM) para a maioria dos isolados multirresistentes de mastite bubalina isolados dos Estados de Pernambuco (7) e Alagoas (11) foi de 60 mg/mL. Apenas dois isolados (*Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa) do Estado de Alagoas apresentaram uma CIM de 30 mg/mL e 15 mg/mL, respectivamente. A concentração bactericida mínima (CBM) frente a estirpe de *Staphylococcus* coagulase positiva foi de 60 mg/mL e de 30 mg/mL frente a estirpe de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Dados sobre a concentração bactericida e inibitória mínima (CBM e CIM) de biossurfactantes produzidos por espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* são escassos. Os dados foram comparados com biossurfactantes de outras espécies de micro-organismos. Corroborando com os dados obtidos neste trabalho Bharali et al. (2011) estudaram o biossurfactante glicolipídico de *Alcaligenes faecalis* e obtiveram uma CIM (16mg/L) inferior e uma CBM maior (32mg/mL) frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632) aos valores alcançados pelo biossurfactante produzido pelo *Streptomyces* sp. DPUA1566.

Valores de CIM inferiores aos apresentados neste estudo foram demonstrados por Das et al. (2009) que reportaram uma CIM de 200 µg/mL para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* do biossurfactante produzido por *Bacillus circulans*. Siddhartha et al. (2010) descreveram uma CIM de 256 µg/mL para os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* ATCC29004, *Rhodococcus equi* ATCC6938 e *Salmonella enterica* ATCC13076 do rhamnolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa* L2-1.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1566 apresentou atividade antimicrobiana frente aos *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de mastite bubalina de rebanho do Estado de Alagoas. O biossurfactante obtido é uma fonte promissora para uso terapêutico em rebanho bubalino com a perspectiva de minimizar as perdas econômicas provocadas por bactérias resistentes a antibióticos usados no controle da mastite. No futuro, as

propriedades biológicas e terapêuticas poderão ser mais exploradas no controle de outros patógenos multidrogerresistentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENINCASA, M. et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288. 2002
- BHARALI, P. et al. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 682-690. 2011.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Microbiology**, v. 7, p. 262-266. 2004.
- COOPER, D. G. et al. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 408-412. 1981.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from to *Bacillus species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229. 1987.
- COSTA, S. G. V. A. O. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488. 2006.
- CHEN, Y-C. et al. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 62-69. 2012.
- CUNHA et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.73, n.1, p.17-21. 2006.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1015-1019. 2009.
- ERSKINE, R. J. et al. Advances in the therapy for mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, p. 499-513. 1993.
- FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951-1957. 2011.
- FERNANDES, P. A. V. et al. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* r14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 704-709. 2007.
- HAMZA, P. A.; CHOUDHURI, P. C. Chemoprophylactic studies on mastitis in buffaloes.

Indian Journal Dairy Science, v. 47, p. 723-6. 1994.

JAIN, R. M. et al. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2320-2326. 2012.

JAVAHERI, M. et al. Anaerobic production of a bisurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Journal of Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 698-700. 1985.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311-318. 2012.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256. 2009.

KUMAR, R. et al. Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. **Microbial Pathogenesis**, v. 51, p. 31-38. 2011.

LANG, S. Biological Amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion I Colloid and Interface Science**, v. 7, p. 12-20. 2002.

LUNA, J. M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP0995. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1527-1534. 2011.

MACHADO, P. F.; BARANCELLI, G.; PEREIRA, A. R. CCS: Leite com mais qualidade e melhor rendimento industrial. **Indústria de Laticínios**, v. 2, p. 65-68. 1998.

MEDEIROS; E. S. et al. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6. 2011.

NCCLS M7 6A. **Reference methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard M7 6A**. National Committee Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA; USA: v. 27. 2003.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, v. 64. p. 117-124. 2005.

NITSCHKE, M. et al. Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *B. subtilis* in cassava wastewater medium. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 591-596. 2004.

OLIVEIRA, F. C. **Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis* P40**. 2004. 123 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

PRIDHAM, T. G. et al. A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, p. 947-953. 1957.

RASHID, A. Studies on mastitis among dairy buffaloes. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 21, n. 4, p. 220-1. 2001.

RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5. 2011.

SARAVANAKUMARI, P.; MANI, K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8851-8854. 2010.

SIDDHARTHA, G. V. et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511-1516. 2010.

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183. 2010.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917. 2008.

VIGUIER, C. et al. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-49. 2009.

YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347. 2004.

Capítulo 5

PATENTE

BIOSSURFACTANTE E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO

Patente depositada no Instituto Nacional de Propriedade industrial - INPI.

BIOSURFACTANTE E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO

Eduardo Francisco dos Santos¹, Leonie Asfora Sarubbo² e Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife-Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Patente de Invenção: “**BIOSURFACTANTE E PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO**”, realizada por espécies de *Streptomyces* isoladas e selecionadas da Região Amazônica. Processo que utiliza água destilada suplementada com óleos vegetais residual de frituras e resíduo da indústria de refino de milho sendo realizado em três etapas: preparo do inóculo, formulação do meio de produção e produção do biossurfactante.

1 Campo de aplicação

Trata-se processo de baixo custo e uma nova fonte microbiológica para produção de um biossurfactante com características desejáveis (alta atividade emulsificante e dispersante) para aplicação em recuperação de áreas contaminadas por petróleo e seus derivados.

A inovação da proposta consiste na produção sustentável de um bioproduto utilizando matérias primas obtida exclusivamente de resíduos industriais viabilizando a produção industrial e minimizando os impactos ambientais.

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e têm causado muitos problemas ecológicos e sociais. Os tratamentos tradicionais, tais como contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes, adsorção por materiais naturais ou sintéticos, entre outros, não visam à degradação do petróleo. A biodegradação apresenta-se como um método efetivo, uma vez que, o petróleo é usado como fonte de carbono através dos processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de baixa massa molecular (ZHANG et al., 2005). A biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos para a conversão microbiana é baixa, limitando assim, a taxa de biodegradação no meio aquoso e o uso de compostos tensoativos, tal como biossurfactantes, apresenta uma melhora na biodegradação dos hidrocarbonetos (URUM et al, 2004).

Nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam. Entretanto nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é devido à necessidade de produtos mais brandos, pela necessidade de substituição de compostos não biodegradáveis e pelo aumento da especificidade dos produtos (BOGNOLO, 1999).

Estima-se que a produção mundial de surfactantes exceda a quantidade de 4 milhões de toneladas por ano e movimenta a quantia de US\$ 9-10 bilhões por ano (BANAT et al., 2000; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os biosurfactantes oferecem muitas vantagens em relação aos surfactantes de origem química, tais como: (a) aceitabilidade ecológica, pois são potencialmente aplicáveis em proteção ambiental (RAHMAN et al., 2002) pela sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN et al., 2002; COSTA, 2005; COSTA et al., 2006); (b) são efetivos em ampla faixa de temperatura e pH (BANAT et al., 2000); (c) podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (BENINCASA et al., 2002; NITSCHKE et al., 2005b) (d) podem ser mais eficientes que os surfactantes químicos (BANAT, 1995).

Os biosurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser utilizados em uma gama de aplicações industriais. Entretanto, ainda não é amplamente utilizado devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

O sucesso da produção do biosurfactante depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de materiais renováveis e de baixo custo, que resultam numa redução de 10-30% do custo total (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

O processo produtivo de biosurfactante com atividade antimicrobiana ainda não está bem estabelecido no estado da arte para aplicação direta em escala industrial, sendo os fatores econômicos os principais empecilhos.

2 Detalhamento do estado da técnica

A literatura apresenta vários tipos de biosurfactantes produzidos por micro-organismos (surfactina - *Bacillus subtilis*; raminolípido - *Pseudomonas aeruginosa*; glicolípido - *Rhodococcus* sp ST-5; lipoproteínas - *Bacillus licheniformis*).

A grande variedade dos biossurfactantes, assim como os tipos, quantidades e qualidades são influenciadas pela natureza do substrato carbônico, concentração de íons N, P, Mg, Fe e Mn presentes no meio de cultura e condições de cultivo como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995).

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea, induzida através da presença de compostos lipídicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de stress como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DESAI e BANAT, 1997).

Considerando os fatores que influenciam a síntese de biossurfactantes, algumas técnicas estão sendo empregadas com o objetivo de estimular ou intensificar a taxa de produção e também diminuir os custos do processo. O emprego de substratos baratos como água residuária rica em amido de batata (FOX; BALA, 2000), gordura animal (DESHPANDE; DANIELS, 1995) ou ainda o controle da adição de sais como manganês e ferro (SHEPPARD et al., 1991), têm sido alternativa exploradas para tornar o biossurfactante comercialmente competitivo.

A utilização de resíduos indústrias como insumos para produção de biossurfactante é uma alternativa viável economicamente e a literatura consta de diversos trabalhos realizados com substratos de origem industrial.

Rufino et al. (2011) descreveram o processo de produção do biossurfactante Rufisan por *Candida lipolytica* UCP 0988, utilizando um meio de produção contendo óleo de soja de resíduo da refinaria e ácido glutâmico, suplementado com minerais (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Neste trabalho, o biossurfactante produzido reduziu a tensão superficial da água de 70 para $25,3 \text{ mNm}^{-1}$ e uma concentração micelar crítica (CMC) de 0,03%. O biossurfactante foi isolado após 72 h de fermentação, com rendimento que variaram de 0,75 a 12 mg/L.

Silva et al. (2010) descreveram o processo de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando o glicerol como fonte de carbono e os elementos minerais KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e NaNO_3 . Neste trabalho, o biossurfactante semipurificado apresentou um rendimento de 8 g/L após 96 horas de

fermentação. A tensão superficial do meio foi reduzida para $27,4 \text{ mNm}^{-1}$ e o índice de emulsificação do hexadecano foi de 75-80%.

Liu e colaboradores (2009) utilizaram resíduos de óleos de fritura, extrato de levedura, extrato de carne e vários elementos minerais (NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) na biossíntese de desemulsificante por *Dietzia* sp. S-JS -1.

Luna et al. (2008) avaliaram a produção do biossurfactante por *Candida sphaerica* utilizando milhocina e resíduo de refinaria de óleo de soja suplementado com uréia, meio Yeast salt water (YSW), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e K_2HPO_4 .

Costa et al. (2008) avaliaram a seleção de microrganismos com capacidade de produzir biotensoativos a partir de meio de produção contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e resíduos de óleos e gorduras gerados em restaurantes e indústrias alimentícias. Borra de soja, gordura de frango, gordura vegetal hidrogenada e óleo de soja usado em frituras foram estudados como fonte de carbono.

Sobrinho et al. (2008) descreveram um meio de baixo custo para a produção de um surfactante por levedura *Candida sphaerica*. O meio é formulado apenas com água destilada, suplementado com 5,0% de resíduos de óleo de amendoim e 2,5% de licor de refinarias de milho, como substratos. O biossurfactante produzido apresenta um rendimento de 4,5 g/L. O biossurfactante mostrou uma tensão superficial de 26 mNm^{-1} e Concentração Micelar Crítica (CMC) de 0,08%.

Lima (2007) realizou produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando meio mineral suplementado com óleo de soja residual de frituras e levedura de cervela residual.

Rufino et al. (2011) descreveram o processo de produção do biossurfactante por *Candida lipolytica*, utilizando um meio de produção contendo óleo de soja de resíduo da refinaria e extrato de levedura. Neste trabalho, o biossurfactante foi isolado após 144 h de fermentação, com rendimento de 4,5 g/L e redução da tensão superficial da água de 71 para 32 mNm^{-1} .

Sarubbo et al. (2006), a partir da *Candida glabrata* UCP 1002, produziram um bioemulsificante utilizando o meio mineral constituído de NH_4NO_3 , KH_2PO_4 ,

MgSO₄.7H₂O, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, óleo de algodão e glicose como fontes de carbono, obtendo 0,26 a 0,93 g/L de rendimento.

Nitschke et al. (2005) avaliaram a produção do biossurfactante raminolipídio a partir de glicerol, glicose, óleo de soja utilizado em frituras, gordura de frango e resíduo de refinarias de óleos.

Sarubbo et al. (2001) utilizaram a levedura *Candida lipolytica* IA 1055 no processo de produção de um bioemulsificante em diferentes concentrações de glicose como fonte de carbono.

O estado da técnica demonstra que vários resíduos industriais são utilizados na formulação de meios utilizados nos processos de produção de biossurfactante, entretanto, são poucos os meios, exclusivamente, constituídos com resíduos industriais.

3 Descrição do invento

O biossurfactante ora descrito é produzido por linhagens de *Streptomyces* spp. isoladas e selecionadas da Região Amazônia depositadas na Coleção do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA).

O novo processo de produção utiliza água destilada suplementada com óleos vegetais residuais de frituras e resíduo da indústria de refino de milho sendo realizado em três etapas: preparo do inóculo, formulação do meio de produção e produção do biossurfactante.

Na primeira etapa, o inóculo é feito com as espécies de bactérias selecionadas, mantidas em Castellanni e transferidas para placas contendo meio sólido Agar ISP-2 (15 g/L de agar, 4 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de extrato de malte) e incubadas em Shaker a 28 a 36°C, durante 24 a 48 horas. Em recipientes contendo o meio líquido Caldo ISP-2 (4 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de extrato de malte) são adicionados cinco discos de Agar com a bactéria crescida em sua superfície, incubados em Shaker a 28 a 36°C, durante 24 a 48 horas.

Na segunda etapa, o meio de produção é feito com água destilada suplementada com os óleos vegetais residual de frituras da indústria de alimentos,

utilizado como fonte de carbono e milhocina, resíduo da indústria de refinação de milho, utilizada como fonte de nitrogênio e elementos minerais. Todos em concentrações que variaram de 0,1 a 10%. Em seguida, o meio de produção é esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 minutos.

Na terceira etapa, a produção é realizada em recipientes contendo uma suspensão de bactéria de 10^8 UFC do inóculo e 1.000 mL do meio de produção, incubados em agitador orbital a temperatura de 28 a 36°C, durante 96 horas. O fermentado é centrifugado para obtenção do líquido metabólico livre de células. O pH do líquido metabólico livre de células é ajustado para 2 com uma solução 6M de HCl. Em seguida, o fermentado acidificado é centrifugado a 3.400 rpm, durante 10 minutos. A fase orgânica é removido, neutralizada com NaOH a 1M e seca em estufa a 35°C para obtenção do produto em pó - biossurfactante isolado.

A produção do biossurfactante é evidenciada através do índice de emulsificação e da medição da tensão superficial (realizada em Tensiômetro Sigma 70) do líquido metabólico livre de células e do biossurfactante isolado. A máxima produção de biossurfactante é obtida em condições específica de pH (5,5 a 8,5), temperatura (28 a 36°C), agitação (100 a 250 rpm), aeração (50 a 90%) e diferentes concentrações da fonte de carbono (0,1 a 10%) e nitrogênio (0,1 a 10%). A tensão superficial do meio de produção é reduzida de 49,27 mNm⁻¹ para valores de 26,53 mNm⁻¹. Os índices de emulsificação do líquido metabólico livre de células são de 95,71% para o óleo de motor queimado, 95,00% para o óleo diesel, 44,97% para o n-hexadecano e de 66,66% para o óleo de soja. O processo de produção apresenta rendimento que varia de 2 a 5g/L de biossurfactante semipurificado e uma CMC de 0,08% após 72 horas de fermentação.

A purificação é realizada através das técnicas de cromatografia em camada delgada (TLC). O extrato parcialmente purificado do biossurfactante (0,3g) é solubilizado em 1 mL de clorofórmio e aprox. 100 L aplicados em placas de 20x20 com uma micropipeta. As placas são colocadas em sistema clorofórmio:metanol:água (65:15:2 v/v/v) e uma pequena porção da placa, 3 cm da origem, é vaporizada com 4-metóxi- benzaldeído em ácido acético e ácido sulfúrico concentrados (0,5:50:1 v/v/v).

Para identificação parcial dos componentes orgânicos são utilizados reveladores de componentes orgânicos. Os vapores de Iodo e 2-5% de dicromato de

potássio ($K_2C_{12}O_7$) em H_2SO_4 seguido de aquecimento a $110^\circ C$ por 15 minutos é utilizado para a revelação de lipídios. Uma solução de 0,2% de ninhidrina em acetona ou etanol é pulverizada sobre as placas para a revelação de aminoácidos. O α -Naftol a 1% em etanol e 0,19% de orcinol em H_2SO_4 a 53% seguido de aquecimento a $100^\circ C$ por 5 min são usados para revelação de carboidratos.

As porções não vaporizadas são retiradas e coletadas, sendo os biossurfactantes extraídos duas vezes com 8 mL de clorofórmio-metanol (1:2 v/v). A extração envolverá agitação em vórtex da mistura solvente e material coletado por 1 minuto, centrifugação da sílica gel por 10 minutos e remoção do solvente, retirando-o da mistura. Os extratos serão secos em atmosfera de N_2 . Os componentes separados terão suas estruturas confirmadas por uma combinação de análise de ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GC-MS), espectro de massa Maldi Tof e infravermelho (IR).

4 Reivindicações

BIOSSURFACTANTE E PROCESSO PARA SUA PRODUÇÃO **caracterizado por:**

1. Processo de obtenção de um novo biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. utilizando meio de produção constituído de óleos vegetais residual de frituras e resíduo de refinaria de milho.
2. Produto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso do líquido metabólico livre de células de *Streptomyces* sp. para uso como bioemulsificante de óleos de origem vegetais e petroquímica.
3. Produto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso do líquido metabólico livre de células de *Streptomyces* sp. para uso como biodispersante na remoção de óleos em ambientes naturais, domésticos e industriais.

4. Produto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso do biossurfactante semipurificado em pó, para uso como bioemulsificante de óleos de origem vegetais e petroquímica.

5. Produto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso do biossurfactante semipurificado em pó, para uso como biodispersante na remoção de óleos em ambientes naturais, domésticos e industriais.

6. Produto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso do biossurfactante semipurificado em solução, para uso como bioemulsificante de óleos de origem vegetais e petroquímica.

7. Produto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo uso do biossurfactante semipurificado em solução, para uso como biodispersante na remoção de óleos em ambientes naturais, domésticos e industriais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANAT, I. M. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal - state of the art (review). **Acta Biotechnologica**, v. 15, n. 3, p. 251-267. 1995.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Potencial commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508. 2000.
- BENINCASA, M. et al. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288. 2002.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and science. A - Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p. 41-52. 1999.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529. 1998.
- COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfatante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. 2005. 87f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE. M.; CONTIERO, J. Produção de biotenssoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34-38. 2008.
- COSTA, S. G. V. A. O. et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 483-488. 2006.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Review**, v. 61, p. 47-64. 1997.
- DESHPANDE M.; DANIELS L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 143-150. 1995.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240. 2000.
- LIMA, C. J. B. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. 2007. 168f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.
- LIU, J. et al. Comparison between waste frying oil and paraffin as carbon source in the production of biodemulsifier by *Dietzia* sp S-JS-1. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6481-6487. 2009.
- LUNA et al. Produção de **biossurfactante** em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**. v. 6, n. 2, p. 209-215. 2008.

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

NITSCHKE, M. et al. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562-1566. 2005.

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

RAHMAN, K. S. M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using lowcost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281. 2002.

RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5. 2011.

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, p. 400-406. 2006.

SARUBBO, L. A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S.l.], n. 95, p. 59-67. 2001.

SHEPPARD, J. D. et al. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1064, p.13-23. 1991.

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183. 2010.

SOBRINHO, H. B. S. et al. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917. 2008.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactant for crude oil contaminated washing. **Chemosphere**, v. 57, p. 1139-1150. 2004.

ZHANG, G. et al. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University**, v. 6, n. 8, p. 725-730. 2005.

Capítulo 6

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *ACTINOMYCETES* SPP.
UTILIZANDO ÓLEO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. COMO
FONTE DE CARBONO

Trabalho completo publicado no XVIII Congresso Nacional de Bioprocessos.

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *ACTINOMYCETES* SPP.
UTILIZANDO ÓLEO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMB. COMO
FONTE DE CARBONO

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *ACTINOMYCETES* SPP. USING
CARYOCAR BRASILIENSE CAMB. OIL AS CARBON SOURCE

Eduardo Francisco dos Santos¹, Leonie Asfora Sarubbo² e Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade Animal. Cep – 52171-900 Recife – PE - E-mail: eduardocta@gmail.com

²Universidade Católica de Pernambuco – Centro de Ciência e Tecnologia Cep – 50050-
900 Recife – PE

RESUMO

A produção de biossurfactante por *Actinomyces* spp. foi estudada. O óleo de *Caryocar brasiliense* Camb. Foi usado como fonte de carbon. A produção de biossurfactante foi evidenciada pela determinação da tensão superficial e índice de emulsificação. Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado. A temperatura de 28°C, pH 8,5, aeração de 200 rpm e oxigenação de 60% foram obtidas como as condições para valores maiores da produção de biossurfactante. A tensão superficial do meio foi reduzida para 23,99 mN/m e apresentou índice de emulsificação de 96,44% após 24 h. O biossurfactante produzido por *Actynomyces* spp. utilizando o óleo de *C. brasiliense* como fonte de carbono apresenta potencial de aplicação pelas industriais farmacêuticas e de petróleo.

Palavras-chave: Biossurfactante, Tensão Superficial, *Actynomyces*, *Caryocar brasiliense*.

ABSTRACT

The production biosurfactant by *Actinomyces* spp. was studied. *Caryocar brasiliense* Camb. oil was used as carbon source. Biosurfactant production was followed by measuring surface tension and emulsification index. A two-level factorial design (2^4) was carried out. The cultural factors which have a significant influence on biosurfactant production were obtained under the optimal conditions of pH 8.5, oxygenation 60%, aeration 200 rpm, temperature 28°C and the interactions among these factories. The surface tension was reduced to 23.99 mNm⁻¹ and emulsification index to 96.44% in 24 h. The biosurfactant produced by *Actinomyces* spp. using *C. brasiliense* oil as carbon source is a surface-active substance, having potential application in industrial pharmaceutical and bioremediation.

Keywords: Biosurfactant, Surface Tension, *Actinomyces*, *Caryocar brasiliense*.

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfífilas produzidas por micro-organismos e apresenta atividade superficial (NITSCHKE; PASTORE, 2006). As propriedades dos biossurfactantes como biodegradabilidade, baixa toxicidade e aceitabilidade ecológica apresentam potencial de aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Os fatores que afetam a produção dos biossurfatantes tem sido estudados por *Pseudomonas*, *Candida* e *Rhodococcus* (SOBRINHO et al., 2008; SILVA et al., 2010; DARVISHI et al., 2011). Vários fatores como pH, temperatura, concentração salina e tipo de substrato influenciam as propriedades físico-químicas de um biossurfactante (RODRIGUES et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi investigar os fatores que afetam a produção de biossurfactante por *Actinomyces* spp. utilizando o óleo de *C. brasilienses* como fonte de carbono.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Actinomyces sp. utilizado para a produção de biossurfactantes foi isolados a partir de líquens da Região Amazônica, pertencente à Coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia (DPUA) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. O micro-organismo foi mantido em Castellani's e armazenados a 28°C.

2.2 Inóculo

O *Actinomyces* spp. foi cultivado em Agar ISP-2: extrato de levedura 0,4% v/v, extrato de malte de 1% v/v; agar 2% v/v). O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução 1,0 M de HCl e seguida esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 min. Cinco discos de *Actinomyces* sp. crescidos em meio agar ISP-2 foram inoculados em Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio caldo ISP-2, incubados em agitador orbital a 200 rpm, temperature 28°C, durante 48 horas.

2.3 Planejamento Fatorial

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para verificar os efeitos e interações das variáveis pH, agitação, aeração (razão entre o volume médio e volume de balão) e a temperatura sobre a variação máxima da tensão superficial e índice de emulsificação. Os valores das variáveis e níveis estão apresentados na Tabela 1. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados com o programa Statistica 6,1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Tab ela 1 - Valores e níveis das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial, para produção de biossurfactante

Variáveis independentes	-1	Ponto central	+1
pH	5.5	7.0	8.5
Oxigenação (%)	60	70	80
Aeração (rpm)	100	150	200
Temperatura (°C)	28	30	32

2.4 Produção do biossurfactante

O *Actinomyces* spp. foi cultivado em agitador orbital (B. BRAUN). A composição do meio mineral utilizado neste estudo foi a seguinte K_2HPO_4 (4,75), NH_4Cl (1,0), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,6), 10 mL de solução mineral (100 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 mg de $CaCl_2 \cdot H_2O$ e 100 mg de $MnCl_2$ e água destilada q.s.p. 100 mL). O óleo de *C. brasiliense* foi usado como fonte de carbon (1,0 g/L). A peptona foi utilizada como fonte de nitrogênio (1,0 g/L).

O pH foi ajustado para 7,0 com uma solução 1,0 M de HCl. O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo o meio de cultivo e esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 min. Em seguida o inóculo foi adicionado a 10^8 UFC/mL. Os frascos foram incubados a 28°C em agitador orbital a 200 rpm, durante 144 horas.

2.5 Métodos analíticos

A tensão superficial do biossurfactante presente no líquido metabólico livre de células foi realizada utilizando um tensiômetro Sigma 700 (KSV Instruments Ltd., Finlândia) pelo método do anel Du Nouy à temperatura ambiente (COOPER et al., 1981).

O índice de emulsificação (IE_{24}) do líquido metabólico livre de células foi determinado utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg et al. (1987) onde 2 mL do líquido metabólico livre de células foi misturado em tubos de ensaio a compostos hidrofóbicos na proporção de 1:1 e homogeneizados em Vortex, durante dois minutos, durante 24 horas.

Em seguida foram efetuadas medidas da altura da Camada Emulsificada (CE) e da Altura Total (AT) dos componentes no tubo de ensaio. O índice de emulsificação foi obtido através da fórmula: $IE_{24} = (CE/AT) \cdot 100$. Todos os métodos foram realizados com o líquido metabólico livre de células obtido por centrifugação a 9.000 x g durante 10 min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo de *C. brasiliensis* apresentou-se como uma fonte de carbono potencial para a produção de biossurfactante por *Actinomycetes* sp..

Trabalhos anteriores tem demonstrado a produção de biossurfactantes por vários micro-organismos utilizando como fonte de carbono óleos vegetal (SARUBBO et al., 2006; NAWAWI et al., 2010; TRAVASI et al., 2011).

A Table 2 apresenta os resultados do planejamento fatorial utilizados para alcançar as maiores produção de biossurfactantes. O planejamento fatorial permite a identificação da variável que desempenha um papel significativo na produção de biossurfactante.

Os dados apresentados indicam que a tensão superficial e o índice de emulsificação variaram de 50,81 a 23,99 mN/m e 9,36 a 96,44%, respectivamente.

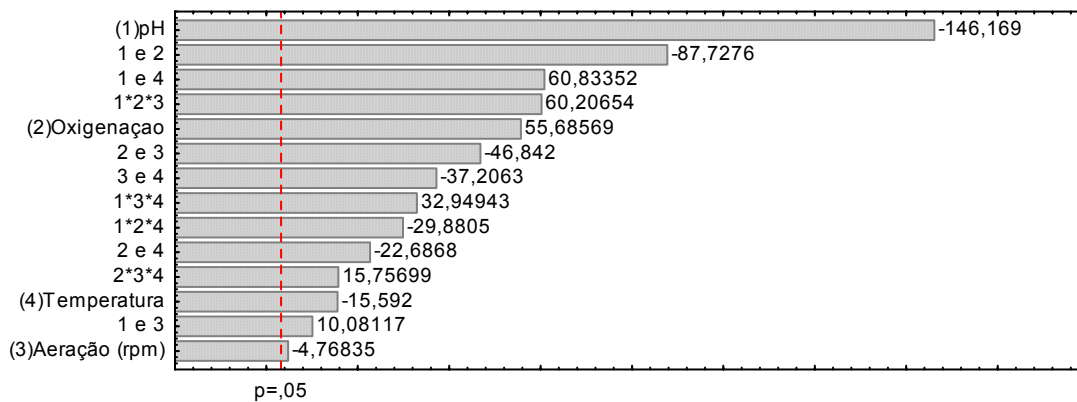
Table 2. Condições e resultados do planejamento experimental 2⁴ selecionado para a produção de biossurfactante

Ensaio	x1	x2	x3	x4	TS mNm ⁻¹	Índice de emulsificação %	
						Óleo de motor	Óleo de soja
1	5.5	60	100	28	29,00 ± 0,08	91,78 ± 1,99	64,78 ± 2,98
2	8.5	60	100	28	26,18 ± 0,12	90,77 ± 0,07	53,31 ± 3,48
3	5.5	80	100	28	50,81 ± 0,35	29,11 ± 0,83	9,36 ± 2,91
4	8.5	80	100	28	24,84 ± 0,02	90,96 ± 1,09	60,88 ± 1,83
5	5.5	60	200	28	44,68 ± 0,31	29,11 ± 0,83	14,18 ± 3,43
6	8.5	60	200	28	23,98 ± 0,01	94,71 ± 0,51	62,18 ± 2,53
7	5.5	80	200	28	42,62 ± 0,28	29,97 ± 0,24	16,86 ± 0,88
8	8.5	80	200	28	31,99 ± 0,17	91,35 ± 1,36	52,05 ± 3,03
9	5.5	60	100	36	33,06 ± 0,16	85,78 ± 4,72	37,12 ± 2,58
10	8.5	60	100	36	32,03 ± 0,03	79,02 ± 1,13	13,81 ± 1,27
11	5.5	80	100	36	43,75 ± 0,29	31,10 ± 0,17	19,30 ± 1,87
12	8.5	80	100	36	26,25 ± 0,05	94,39 ± 1,16	64,38 ± 3,66
13	5.5	60	200	36	28,76 ± 0,04	90,84 ± 0,91	59,84 ± 2,21
14	8.5	60	200	36	31,23 ± 0,11	40,11 ± 0,62	43,13 ± 0,21
15	5.5	80	200	36	36,33 ± 0,12	44,30 ± 1,08	29,49 ± 1,95
16	8.5	80	200	36	26,77 ± 0,06	94,12 ± 0,21	56,62 ± 2,48
17	7.0	70	150	32	24,28 ± 0,00	96,44 ± 0,00	66,18 ± 0,00
18	7.0	70	150	32	24,14 ± 0,00	94,72 ± 0,00	65,98 ± 0,00
19	7.0	70	150	32	24,22 ± 0,00	96,32 ± 0,00	64,09 ± 0,00
20	7.0	70	150	32	24,31 ± 0,00	95,43 ± 0,00	63,97 ± 0,00

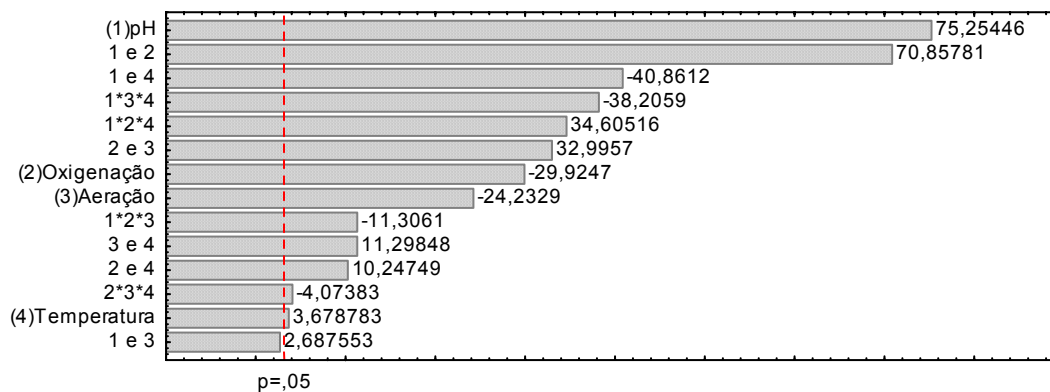
x1 = pH, x2 = oxigenação (%), x3 = agitação (rpm) e x4 = temperatura (°C). Os valores em negrito representam as melhores condições para a tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (IE)

A Figura 1 apresenta o gráfico de Pareto, com nível de confiança de 95%, para os efeitos estimados em valores absolutos para TS (a), IE - óleo de motor (b) e IE - óleo

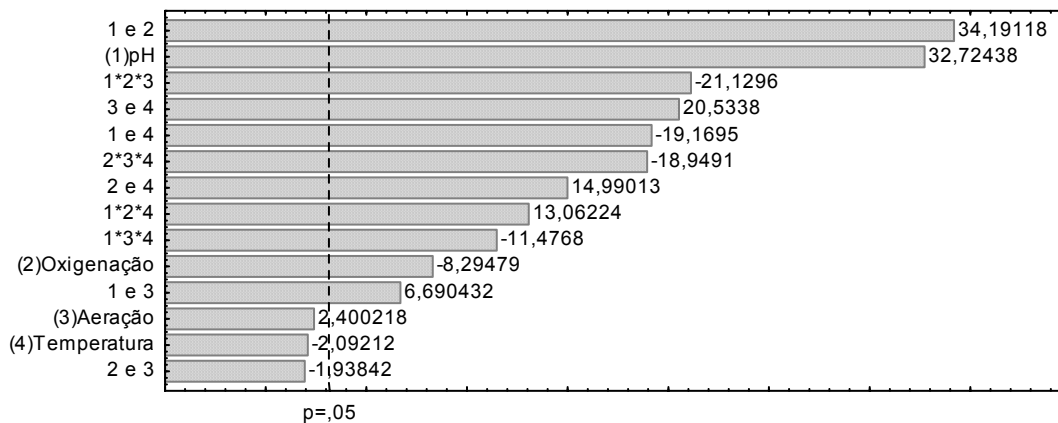
de soja (c). É possível observar que o fator principal para os valores da TS e o percentual do EI foram as variáveis independentes pH e a oxigenação.



(a)



(b)



(c)

Efeitos Estimados Observados (Valor absoluto)

Figura 1. Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis avaliadas sobre tensão superficial (a), índice de emulsificação - óleo do motor (b) e óleo de soja (c), do biossurfactante produzido por *Actinomyces* spp. após 96 horas de cultivo

Os fatores temperatura e agitação foram apenas estatisticamente significativos para a TS. O aumento da oxigenação e da interação do pH com a temperatura mostraram efeitos positivos sobre a TS. Os resultados da TS demonstraram que o efeito negativo do pH foi o mais significativo, isto é, a TS aumenta com o pH em seu nível menor. A interação entre o pH e a oxigenação foi negativa, o que indica que as diminuições simultâneas em ambas as variáveis levaram a maiores valores da tensão superficial.

Os resultados do IE para o óleo de motor (b) demonstraram que o efeito positivo do pH foi o mais significativo, isto é, este parâmetro aumentou com o pH em seu nível mais alto (8,5). A interação entre o pH e a oxigenação foi positiva, o que indica que os aumentos simultâneos em ambas as variáveis levaram a maiores índices de emulsificação. Observa-se na Figura 1 (c) que o fator principal para o percentual de IE foi a interação pH com a oxigenação, sendo que este valor foi estatisticamente positivo, o que indica que o aumento em ambas as variáveis favorece o aumento dos IE frente ao óleo de soja. Por outro lado, a temperatura não influenciou significativamente sobre os IE estudados.

O efeito do pH sobre a redução da tensão superficial tem sido relatado para biossurfactantes a partir de diferentes micro-organismos (SILVA et al., 2010; NAJAFI et al., 2011). A temperatura de 28°C, pH 8,5, aeração de 200 rpm e oxigenação de 60% foram obtidas como as condições para valores maiores da produção de biossurfactante, através do planejamento experimental. Estes dados foram superiores com os relatados na literatura.

Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com biossurfactantes produzidos por outras espécies de micro-organismos como *Serratia marcescens* (ROLDÁN-CARRILLO et al., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA et al., 2010), *Candida tropicalis* (BATISTA et al., 2010), *C. glabrata* (LUNA et al., 2009) e *C. lipolytica* (SARUBBO et al., 2001; RUFINO et al., 2010) e indica que *Actinomicetes* spp. apresentou potencial capacidade de produzir substâncias com atividade superficial.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, os resultados obtidos mostraram que o biossurfactante produzido por *Actinomicetes* spp. apresenta potenciais propriedades emulsificante e atividade superficial. O pH foi a variável que mais influenciou os valores da tensão superficial e o índice de emulsificação. Todos os resultados descritos caracterizam este composto como um biossurfactante com potencial para aplicações nas industriais farmacêuticas e petróleo. Novos experimentos serão realizados para caracterizar o biossurfactante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, R. M. et al. Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. **Water Environment Research**, v. 82, n. 5, p. 418-25. 2010.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from to *Bacillus species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229. 1987.

DARVISHI, P. et al. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p. 292-300. 2011.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A. New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793. 2009.

Najafi, A. R. et al. Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 33-39. 2011.

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

NAWAWI, W. M. F. W.; JAMAL, P.; ALAM. M. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. **Bioresourcer Technology**, v. 101, n. 23, p. 9241-9247. 2010.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresoucer Technology**, v. 97, n. 2, p. 336-341. 2006.

RODRIGUES, L. et al. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 1-10. 2006.

ROLDÁN-CARRILLO, T. et al. Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 384-389. 2011.

RUFINO, R. D. et al. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 907-914. 2008

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. 2006.

SARUBBO, L. A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59-67. 2001

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183. 2010.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917. 2008.

STATISTICA (Data Analysis Software Systems) Statsoft Inc., Version 8.0 (2008).

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. B. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3366-3372. 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as quarenta e uma linhagens avaliadas quanto à produção de biossurfactantes, o micro-organismo *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi aquele que apresentou melhor desempenho na redução da tensão superficial, emulsificação tipo A/O e menores valores de CMC, quando cultivado em resíduos agroindustriais como milhocina e óleo de soja residual de frituras.

A linhagem de *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolada de líquens da Região Amazônica apresenta potencial como micro-organismo produtor de biocompostos com atividade surfactante e emulsificante.

O micro-organismo *Streptomyces* sp. DPUA1566 foi capaz de crescer e produzir surfactantes em óleo de pequi e óleo de soja residual de frituras, demonstrando excelentes resultados de emulsificação tipo O/A e por isso se destacando como um micro-organismo potencialmente aplicável em processos de emulsificação e biorremediação.

Em trabalhos futuros, a metodologia de superfície de resposta poderá ser explorada para otimização dos constituintes do meio de cultivo e as condições físicas como pH, oxigenação e aeração.

O aumento da escala de produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1566, também é necessário além da adequação dos parâmetros experimentais durante a ampliação de escala.

No futuro, as propriedades biológicas e terapêuticas poderão ser mais exploradas no controle de patógenos multidrogarresistentes.

Os estudos de purificação e caracterização química completa do biossurfactante possibilitaram sua indicação para aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentos, cosméticos, ambientais e petróleo.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira pelos isolados cedidos de *Streptomyces* spp. de líquens da Região Amazônica, pertencentes à Coleção de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA).

Ao Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota pelas estirpes cedidas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes isolados de mastites subclínica de búfalas da raça Murrah, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco – IFPE – “*Campus*” Vitória de Santo Antão pela valiosa oportunidade.

ANEXOS

Anexo 1 – Comprovante do depósito de pedido de patente

< Uso exclusivo do INPI >	
 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL 28/12/2011 019110000351 16:06 REPE 0060221108020229	
Espaço reservado ao protocolo	Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

1.2 Qualificação: UNIVERSIDADE

1.3 CNPJ/CPF: 24416174000106

1.4 Endereço Completo: R. DOM MANOEL DE MEDEIROS S/N - DOIS IRMÃOS - RECIFE - PE

1.5 CEP: 52171-900 1.6 Telefone: 81 3320-6000 1.7 Fax: 81 3320-6000

1.8 E-mail: DIRETORIA@INOVATEC.UFRPE.BR

continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Anexo 2 – Certificado do evento

