



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *Bacillus***

***amyloliquefaciens* IT45**

**FREDERICO ALVES LIMA**

**Uberlândia – MG**

**2017**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 14 DE JULHO DE 2017.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Míriam Maria de Resende  
Orientadora (PPGEQ/UFU)

---

Prof. Dr. Eloizio Júlio Ribeiro  
Co - Orientador (PPGEQ/UFU)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Líbia Diniz Santos  
(PPGEA/UFU)

---

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho  
(PPGEQ/UFU)

---

Dr. Alan William Vilela Pomella  
Gerente de Pesquisa e Desenvolvimento – Laboratório de  
Biocontrole Farroupilha-Lallemand

***Dedico aos meus pais, Frede e Eliane.***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho, em especial:

A minha família, com carinho minha mãe Eliane, meu pai Frede e meu irmão Guilherme, pelo incentivo e amor. Sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado!

Aos professores e orientadores Miriam Maria de Resende e Eloizio Júlio Ribeiro, pela oportunidade, apoio, paciência e ensinamentos de inestimável valor.

A professora Líbia por suas sugestões neste trabalho e também pela iniciativa da parceria com o Laboratório de Biocontrole Farroupilha – Lallemand.

Ao Laboratório de Biocontrole Farroupilha – Lallemand, pelo apoio financeiro.

Ao gerente de Pesquisa & Desenvolvimento Alan W. V. Pomella, pelos ensinamentos, confiança e parceria.

Aos amigos do setor de P&D da Farroupilha pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Aos funcionários da FEQUI/UFU e colegas do NUCBIO pela atenção e auxílio.

A todos os professores da FEQUI que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante a pesquisa.

E agradeço a Deus, por toda força concedida nos momentos difíceis.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Objetivo Geral.....	3
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Controle Biológico.....	3
2.2 Produção de compostos antimicrobianos por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	5
2.3 Surfactantes de Origem Microbiana .....	6
2.3.1 Tipos de biossurfactantes .....	7
2.3.2 Surfactina .....	9
2.3.3 Iturina .....	11
2.3.4 Funções e propriedades dos biossurfactantes.....	12
2.3.5 Metodologias para Caracterização e quantificação dos biossurfactantes .....	15
2.3.6 Exemplo de aplicação dos biossurfactantes .....	16
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 Microrganismo.....	19
3.2 Preservação em solo estéril.....	20
3.3 Meio de cultivo .....	20
3.3.1 Meio de reativação .....	20
3.3.2 Meio para crescimento de <i>Bacillus</i> .....	21
3.3.3 Definição de faixas de concentração para desenvolvimento do Planejamento Composto Central .....	22
3.4 Sistema experimental utilizado .....	22
3.4.1 Ativação do microrganismo .....	22

3.4.2 Fermentação em mesa agitadora .....	23
3.4.3 Fermentação em biorreator .....	25
3.5 Métodos Analíticos .....	27
3.5.1 Viabilidade Celular .....	27
3.5.2 Determinação de Glicose, Maltose e Açúcar Residual .....	27
3.5.3 Tensão Superficial.....	28
3.5.4 Biossurfactantes Totais .....	28
3.5.5 Atividade Antimicrobiana.....	29
3.6 Caracterização e quantificação da Surfactina .....	29
3.6.1 Precipitação e extração.....	29
3.6.2 Análise cromatográfica .....	30
3.6.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do biossurfactante produzido pelo <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45 .....	30
 <b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	 31
4.1 Testes preliminares .....	31
4.1.1 Seleção de meio de cultura para produção do <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45 .....	31
4.1.2 Estudo de condições para desenvolvimento do Planejamento Composto Central .....	32
4.1.3 Estudo do recipiente fermentativo para fermentação em mesa agitadora.....	33
4.2 Produção de Biossurfactantes por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45 em mesa agitadora.....	35
4.2.1 Avaliação da Tensão Superficial frente à suplementação do meio de cultura.....	36
4.2.2 Avaliação do consumo de substrato frente à suplementação do meio de cultura.....	42
4.2.3 Avaliação da produção de Biossurfactantes Totais frente à suplementação do meio de cultura.....	49
4.2.4 Acompanhamento do crescimento celular e pH.....	55
4.3 Análise de condições fermentativas para fermentação em biorreator piloto, visando à produção da Surfactina .....	56
4.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45 .....	62
4.5 Ação Antimicrobiana frente a fungos de diferentes gêneros .....	63

<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>65</b>
5.1 Conclusões .....	65
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	66
 <b>ANEXOS .....</b>	 <b>68</b>
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	 <b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Representações molecular do lipopeptídio Surfactina A (Adaptado de DELEU et al. (1999)).	9
Figura 2.2: Estrutura química e isômera da ituria A (MORAN et al., (2009)).	11
Figura 2.3: : Relação entre a concentração de biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas (WHANG et al. (2008)).	14
Figura 3.1: Impressão digital RAPD-PCR da cepa IT45.	19
Figura 3.2: Identificação da cepa por microscópio de varredura.	19
Figura 3.3: Material preservado.	20
Figura 3.4: Mesa agitadora industrial.	25
Figura 3.5: Planta Piloto utilizada.	26
Figura 4.1: Perfil cinético do crescimento celular.	32
Figura 4.2: Açúcar residual. Barra azul referente ao Ensaio 1 e barra vermelha referente ao Ensaio 2.	33
Figura 4.3: Perfil cinético de crescimento para ensaio de definição de recipiente fermentativo.	34
Figura 4.4: Açúcar residual do ensaio de definição de recipiente fermentativo. Barra azul referente ao Ensaio 1 e barra vermelha referente ao Ensaio 2.	35
Figura 4.5: Diagrama de Pareto em relação as variáveis estudadas para tensão superficial.	37
Figura 4.6: Distribuição dos resíduos relativos à tensão superficial.	37
Figura 4.7: Valores preditos em função dos valores observados relativos à tensão superficial.	38
Figura 4.8: Curva de contorno para concentrações de extrato de levedura e xarope de glicose na redução da tensão superficial.	39



Figura 4.9: Superfície de resposta para tensão superficial em relação ao extrato de levedura e xarope de glicose.....	39
Figura 4.10: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e xarope de glicose na redução da tensão superficial.....	40
Figura 4.11: Superfície de resposta para tensão superficial em relação ao cloreto de cálcio e xarope de glicose.....	40
Figura 4.12: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e extrato de levedura na redução da tensão superficial. ....	41
Figura 4.13: Superfície de resposta para tensão superficial em relação ao cloreto de cálcio e extrato de levedura. ....	41
Figura 4.14: Diagrama de Pareto em relação as variáveis estudadas para açúcar residual. ....	43
Figura 4.15: Distribuição dos resíduos relativos ao açúcar residual. ....	43
Figura 4.16: Valores preditos em função dos valores observados relativos ao açúcar residual. ....	44
Figura 4.17: Curva de contorno para concentrações de extrato de levedura e xarope de glicose objetivando a redução do açúcar residual. ....	45
Figura 4.18: Superfície de resposta para açúcar residual em relação ao extrato de levedura e xarope de glicose.....	45
Figura 4. 19: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e xarope de glicose objetivando a redução do açúcar residual. ....	46
Figura 4.20: Superfície de resposta para açúcar residual em relação ao cloreto de cálcio e xarope de glicose. ....	46
Figura 4.21: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e extrato de levedura objetivando a redução do açúcar residual. ....	47
Figura 4.22: Superfície de resposta para açúcar residual em relação ao cloreto de cálcio e extrato de levedura.....	47
Figura 4.23: Consumo da glicose. ....	48
Figura 4.24: Consumo da maltose. ....	49

Figura 4.25: Diagrama de Pareto em relação as variáveis estudadas para açúcar residual. .....	50
Figura 4. 26: Distribuição dos resíduos relativos aos biossurfactantes totais. ....	50
Figura 4.27: Valores preditos em função dos valores observados relativos aos biossurfactantes totais.....	51
Figura 4.28: Curva de contorno para concentrações de extrato de levedura e xarope de glicose objetivando a máxima produção de biossurfactante. ....	52
Figura 4.29: Superfície de resposta para biossurfactantes totais em relação ao extrato de levedura e xarope de glicose.....	52
Figura 4.30: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e xarope de glicose objetivando a máxima produção de biossurfactante ....	53
Figura 4.31: Superfície de resposta para biossurfactantes totais em relação ao cloreto de cálcio e xarope de glicose.....	53
Figura 4.32: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e extrato de levedura objetivando a máxima produção de biossurfactante. ....	54
Figura 4.33: Superfície de resposta para biossurfactantes totais em relação ao cloreto de cálcio e extrato de levedura. ....	54
Figura 4.34: Concentração celular e pH para amostragem 48 horas. ....	56
Figura 4.35: Cinética de crescimento celular para fermentações em biorreator. ....	57
Figura 4.36: Cinética de produção da Surfactina. ....	58
Figura 4.37: Açúcar residual em 48 horas de processo fermentativo.....	58
Figura 4.38: Cinética de consumo da Glicose. ....	59
Figura 4.39: Cinética de consumo da Maltose. ....	59
Figura 4.40: Acompanhamento do pH das fermentações.....	61
Figura 4.41: FTIR – Espectrogramas vibracionais na região do infravermelho para A (Surfactina padrão Sigma Aldrich), B (caldo fermentado livre de células) e C (Surfactina purificada). ....	62

Figura 4. 42: Atividade antifúngica contra 5 fungos de diferentes gêneros.....	64
--------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Produtos comerciais à base de bactérias no mercado mundial (adaptado LUZ (1996); MELO (1998)). .....	4
Tabela 2.2: Principais tipos de biossurfactantes e seus receptivos microrganismos produtores. ....	8
Tabela 2.3: Possíveis aplicações em diversos setores industriais.....	17
Tabela 3.1: Composição do meio de cultura para crescimento de <i>Bacillus sp.</i> .....	21
Tabela 3.2: Avaliação das concentrações de xarope de glicose, de extrato de.....	22
Tabela 3.3: Avaliação de tratamentos para estudo de recipiente fermentativo. ....	23
Tabela 3.4: Concentrações dos reagentes proposta pelo Planejamento Composto Central. ....	24
Tabela 3.5: Concentrações do meio de cultura e inóculo para fermentação em biorreator. ....	26
Tabela 4.1: Resultados dos Testes Preliminares 1 – Escolha do Meio de Cultivo.....	31
Tabela 4.2: Concentrações das variáveis proposta pelo Planejamento Composto Central e resultados das respostas. ....	36
Tabela 4.3: Atividade antimicrobiana dos metabólitos excretados pelo <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45 fungos de diferentes gêneros. ....	63

## LISTAS DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas;
CMC	Concentração Micelar Crítica;
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
HPLC	High Performance Liquid Chromatography;
EM	Espectroscopia de Massas;
MS	Mass Spectrometry;
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética;
IR	Espectroscopia de Infravermelho;
MALDI-TOF	Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com tempo de Voo;
FAB-MS	Bombardeamento de Átomos Rápido;
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformadas de Fourier;
SIR	Selected Ion Recording;
SIM	Selected Ion Monitoring;
EMAR	Espectroscopia de Massas de Alta Resolução;
RAPD-PCR	Random Amplified Polymorphic DNA-PCR;
Meio LBC	Meio de cultura adaptado do meio TSA (tryticase soy agar) pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha.
X1	Xarope de Glicose da marca Glucodry;
X2	Extrato de Levedura;
X3	Cloreto de Cálcio;

TGS	Triglycine Sulfato;
TS	Tensão Superficial;
AR	Açúcar Residual;
BST	Biossurfactantes Totais;
rpm	Rotações por minuto;
vvm	Volume de ar por volume de meio de cultura por minuto;
CFU	Unidades Formadoras de Colônias;
$Abs_{650nm}$	Absorbância lida no comprimento de onda de 650 nm;
$N_v$	Número de células bacterianas viáveis.

## RESUMO

Biossurfactantes são moléculas de origem microbiana que possuem importante ação na redução tensão superficial. Dentre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente a Surfactina. Estes biocompostos apresentam uma série de vantagens que potencializam suas aplicações, tais como: estabilidade frente a condições extremas (pH, temperatura), diversidade de estruturas químicas, excelentes propriedades superficiais e ecológicas, ação antibiótica frente a microrganismos patogênicos, dentre outras. Diante deste contexto, neste trabalho foi avaliada a produção de biossurfactantes totais e a Surfactina por *Bacillus amyloliquefaciens* IT45, quando variada a concentração dos reagentes presentes no meio de cultivo. As fermentações submersas foram realizadas em mesa agitadora industrial e em biorreator piloto de capacidade 40 litros. Para aperfeiçoar a concentração dos reagentes presentes no meio de cultura, um Planejamento Composto Central foi desenvolvido com propósito de avaliar a influência de três variáveis (xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio) na tensão superficial, na produção de biossurfactantes totais e no açúcar residual. Depois das análises estatísticas, quando as variáveis estavam nas concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de 20 para xarope de glicose, 15 para extrato de levedura e 4 para cloreto de cálcio, a tensão superficial ( $\text{mN/m}$ ) foi reduzida de valores acima de 50 para 30, o açúcar residual foi mínimo e igual a 31% e a produção de biossurfactantes totais foi máxima e igual a  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ , depois de um período de cultivo de 48 horas. A caracterização do biossurfactante sugeriu a presença da Surfactina e este composto foi quantificado no tempo de retenção de 13,5 minutos. Com intuito de saber a real produção de Surfactina e crescimento biomassa celular, foram feitas fermentações em biorreator piloto de 40 litros e os resultados mostraram bastantes favoráveis. O tratamento com maior destaque foi referente à receita sugerida pelo Planejamento Composto Central em que o xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio estavam nas concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de 20, 15 e 4, respectivamente. Neste cultivo o crescimento celular de  $6,0 \times 10^9 \text{ CFU.mL}^{-1}$ , produção de Surfactina de  $0,63 \text{ g.L}^{-1}$  e açúcar residual de 28%. Também foi realizado teste de atividade antimicrobiana contra 5 fungos patogênicos de diferentes gêneros. O caldo fermentado livre de células mostrou-se promissor, pois causou inibição em 4 fungos dos 5 estudos. Portanto, os resultados demonstram que o *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 tem

potencial para produção de biocompostos, uma vez que não necessita de altas concentrações de fonte de carbono e nitrogênio para seu desenvolvimento.

**Palavras-chaves:** Biossurfactante, *Bacillus amyloliquefaciens*, Surfactina, biorreator, atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Biosurfactants are molecules of microbial origin that have superficial action. Among the most effective are the lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus*, especially surfactin. These biological products have a number of advantages that potentiate their applications, such as: stability to extreme conditions (pH, temperature), diversity of chemical structures, excellent surface and ecological properties, antibiotic action against pathogenic microorganisms, etc. In this context, the productions of total biosurfactants and Surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 were evaluated when the reagents concentration present in the culture medium varied. The submerged fermentations were carried out in an industrial shaker and in a pilot bioreactor of 40 liters capacity. In order to improve the reactants concentration, a Central Composite Design was developed to evaluate the influence of three variables (glucose syrup – Glucodry, yeast extract and calcium chloride) on superficial tension, total biosurfactant production and residual sugar. After statistical analyzes, when the variables were in the concentrations ( $\text{g.L}^{-1}$ ) of 20 for Glucodry, 15 for yeast extract and 4 for calcium chloride, the superficial tension ( $\text{mN/m}$ ) reduces values above 50 to about 30, the residual sugar was minimal, around 31% and the total biosurfactant production was maximum, around  $5.5 \text{ g.L}^{-1}$ , after a period of 48 hours. The characterization of the biosurfactant identified Surfactin presence that was quantified in the retention time of 13.5 minutes. In order to know the real production of Surfactin and cellular biomass growth, fermentations were made in a 40 liter pilot bioreactor and the results were quite favorable. The most important culture medium suggested by the Central Composite Design, where glucose syrup, yeast extract and calcium chloride were in the concentrations ( $\text{g.L}^{-1}$ ) of 20, 15 and 4, respectively. For this fermentation, the cellular growth was  $6.0 \times 10^9 \text{ CFU.mL}^{-1}$ , Surfactin production was  $0.63 \text{ g.L}^{-1}$  and residual sugar was 28%. The results demonstrate that *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 has potential to produce biosurfactants and does not require high concentrations of carbon and nitrogen sources for its development.

**Key- words:** Biosurfactants, *Bacillus amyloliquefaciens*, Surfactin, bioreactor, antimicrobial activity



## 1. INTRODUÇÃO

Na agricultura moderna há a necessidade de se produzir cada vez maior volume de alimentos, minimizar os custos operacionais e reduzir ao máximo os impactos no meio ambiente. Como alternativa ao uso de agroquímicos, as bactérias promotoras de crescimento das plantas junto à ação de vários fungos contra patógenos, têm se mostrado uma ferramenta promissora e viável.

Estes agentes são chamados microrganismos endofíticos, pois são capazes de habitar o interior da planta, ou em parte dela, em todo seu ciclo de vida sem causar qualquer tipo de sintoma visível de sua presença SAIKKONEN (2007) e GUO et al. (2008). O uso desses microrganismos, em sua maioria bactérias, tem gerado bons resultados dentro do controle biológico de várias doenças. Com este intuito, pesquisas que avaliam a utilização de produtos biológicos como os biossurfactantes com ação antimicrobiana têm crescido em todo o mundo.

Os biossurfactantes ou tensoativos constituem uma classe importante de compostos naturais com potencial utilização em diversos setores industriais. São compostos ativos que possuem uma estrutura comum formada por uma porção lipofílica e outra hidrofílica. A primeira, usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou vários ácidos graxos, os quais podem ser hidroxilados, ramificados, saturados ou insaturados. A parte lipofílica é ligada à hidrofílica que pode ser um éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxilato, aminoácido ou carboidrato.

Diante das características mais relevantes dos biossurfactantes se destacam a tolerância a temperatura, pH e força iônica, além de serem facilmente biodegradados e apresentarem baixa toxicidade, consequentemente apresentam fácil aceitabilidade ecológica MULLIGAN (2005), YEH et al. (2006). O potencial de aplicação dos surfactantes de origem microbiana é baseado em suas propriedades funcionais que incluem emulsificação, separação, solubilização, demulsificação, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Tais propriedades são aplicadas em diversos campos da indústria alimentícia, de bebidas, papel, têxtil, farmacêutica, indústria de cosméticos e, principalmente, na agricultura BOGNOLO (1999), MULLIGAN et al. (2001).

Algumas linhagens de *Bacillus* são capazes de produzir lipopeptídeos cíclicos com caráter surfactante. Muitos desses lipopeptídeos apresentam potente atividade antibiótica, e tem sido objetivo de diversos estudos na descoberta de novos antibióticos,

destacando a Surfactina que corresponde a um dos biossurfactantes mais potentes, que se tem conhecido até o presente momento. CAMEOTRA; MAKKAR (2004).

A literatura apresenta vários estudos, como, por exemplo, YU et al. (2002) trabalhando com cepa GA1 de *Bacillus amyloliquefaciens*, detectaram ação antifúngica contra *Rhizoctonia solanis*. Esses pesquisadores também conseguiram isolar os lipopeptídeos antimicrobianos iturina A1, bacilomicina e mucosubtilina. No DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS da UFPE, estudos realizados com *B. subtilis* R14 demonstraram a produção de compostos lipopeptídeos efetivos no controle de *Xantomonas campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas, em cultivos realizados com meio à base de glucose MONTEIRO et al. (2005).

Fungos e oomicetos patógenos de plantas foram controlados devido à elevada atividade inibitória da cepa GA1 de *Bacillus amyloliquefaciens*. Além disso, reduziu-se a infecção pós-colheita de maçãs por *Botrytis cinérea*, agente causador da doença do mofo cinzento. Ainda, apresentou diminuição das doenças nas plântulas pela ação de antibiose direta contra patógenos oriundos do solo, quando foram utilizadas no tratamento de sementes. Os dados sugerem que a cepa GA1 apresenta enorme potencial como agente de biocontrole TOURE et al. (2004) E ARGUELLES-ARIAS et al. (2009).

Vale salientar que, apesar de todas as características apresentadas pelos surfactantes naturais, ainda não é economicamente competitivo. O alto custo de sua produção associado à utilização de substratos caros e métodos ineficientes de recuperação de produtos, torna-o não competitivo com surfactantes sintéticos FOX; BALA (2000).

Para suprir as altas quantidades necessitadas pela indústria é fundamental reduzir os custos de produção para tais bioprodutos poderem ser competitivos no mercado. A suplementação do meio de cultivo para obtenção dos biotensoativos é um dos fatores a ser pensado. O uso de substratos alternativos, ricos em carboidratos e/ou lipídios para crescimento dos microrganismos e biossíntese dos biossurfactantes, como, por exemplo, aqueles provenientes da agroindústria MUKHERJEE; DAS (2005) e GALLERT; WINTER (2002).

Neste contexto, este trabalho de pesquisa avaliou a produção de biossurfactantes por *Bacillus amyloliquefaciens* IT45, quando submetida à variação da concentração de alguns reagentes do meio de cultivo economicamente viável.

## 1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho apresenta como objetivo geral a otimização de meio de cultura para produção de biossurfactantes pela fermentação líquida do *Bacillus amyloliquefaciens* (IT45).

### Objetivos Específicos

- Avaliar entre nutrientes pré-selecionados quais são importantes para o crescimento da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens*, e para a produção de biossurfactantes.
- Otimizar por meio de um Planejamento Composto Central as concentrações destes nutrientes.
- Estudar condições selecionadas pelo PCC em Biorreator Piloto de 40L.
- Avaliar a produção da Surfactina entre os produtos formados por essa bactéria.
- Analisar o comportamento antifúngico do caldo fermentado e do bioproduto extraído.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Controle Biológico

Tradicionalmente, o uso de pesticidas químicos tem sido bastante eficiente no controle de várias pragas que atingem plantações mundiais. Doenças como a bruzone do arroz, causada por *Pyricularia oryzae* (Japão, II Guerra Mundial), requeima do arroz, causada por *Phytophthora infestans* (Irlanda, meados do século XIX), deixaram milhares de pessoas famintas, por isso o controle químico foi crucial OKU (1994).

Diante de toda preocupação ecológica, o controle químico tem sido repensado na agricultura atual. Microrganismos antagonistas estão sendo uma via alternativa no controle de doenças de plantas HIRAOKA (1992). Desta forma, foi introduzido o termo Controle Biológico, que pode ser descrito como a influência de um organismo antagonista sobre o patógeno, causando diminuição dos efeitos provocados por esse

último, na planta hospedeira. O biocontrole é composto por três agentes: o patógeno, a planta hospedeira e o antagonista. O primeiro é o agente que causa a doença podendo ser vírus, fungo, bactéria, protozoário, entre outros. O antagonista é o agente biológico com capacidade de interferir nos processos vitais do fitopatógeno Mariano et al. (2000). Vários gêneros de bactérias como, por exemplo, *Actinoplanes*, *Alcaligenes*, *Azobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *bacillus*, entre outras WELLER (1988), podem ser denominadas de antagonistas.

Dentre as bactérias de maior interesse no biocontrole, estão aquelas chamadas de Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (BPCP). Este termo vem sendo usado para descrever estes microrganismos que podem colonizar a superfície e ou interior de plantas, estimulando o crescimento destas quando aplicado em sementes, raízes ou tubérculos CHANWAY et al. (1991). Em geral, as BPCP exercem esse efeito de forma direta quando, na ausência de fitopatógeno, elas próprias estimulam crescimento através da produção de hormônios de crescimento, aumento da absorção de água e nutrientes, fixação de nitrogênio, mineralização de nutrientes, contribui de forma indireta pelo controle biológico.

Vários produtos à base de bactérias têm sido comercializados com efeitos de bioproteção e aumento de crescimento de plantas. A Tabela 2.1 mostra os gêneros mais utilizados nestes produtos.

Tabela 2.1: Produtos comerciais à base de bactérias no mercado mundial (adaptado LUZ (1996); MELO (1998)).

PRODUTO	Bactérias
Galtrol-A, Agrocin, Diegall	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
Quantum-4000	<i>Bacillus subtilis</i> (GB 03)
YIB (BARs)	<i>Bacillus spp.</i>
Nogall	<i>A. radiobacter</i> (K 1026)
Dagger, Conquer	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Blue Circle, Intercept	<i>P. cepacia</i>
Kodiak	<i>B. subtilis</i> (GB 03) melhorado
Kodiak Plus	<i>B. subtilis</i> + apron <sup>1</sup> + terraclor <sup>2</sup>
Deny	<i>Burkholderia cepacia</i>
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i>
RHIZOCELL C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45

RIZOS	<i>Bacillus subtilis</i> UFPEDA 764
ONIX	<i>Bacillus methylophilus</i> UFPEDA 20
STARFIX	<i>Rhizobium tropici</i> SEMIA 408
AZOS	<i>Azospirillum brasilense</i> AbV-5
BtControl	<i>Bacillus thuringiensis</i>
NemaControl	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Simbiose Maíz	<i>Azospirillum brasilense</i>

---

<sup>1</sup> apron = fungicida à base de metalaxil (p.a).

<sup>2</sup> terraclor = fungicida à base de quintozone (p.a).

Estes microrganismos abrangem um grande número de gêneros e espécies Gram-positivas e Gram-negativas. A maioria das espécies documentadas pertence ao gênero *Pseudomonas* (Gram-negativa) e *Bacillus* (Gram-positivas). Outros gêneros como: *Serratia*, *Erwinia* (Gram-negativas), *Streptomyces*, *Arthrobacter* (Gram-positivas) Luz (1996).

## 2.2 Produção de compostos antimicrobianos por *Bacillus amyloliquefaciens*

Condições de estresse nutricional de bactérias do gênero *Bacillus* ativa como resposta vários mecanismos de defesa, incluindo esporulação, síntese de enzimas extracelulares degradativas e produção de antibióticos. A atividade antimicrobiana de *Bacillus* é bastante interessante de ser investigada uma vez que espécies deste gênero produzem um grande número de peptídeos e lipopeptídeos antimicrobianos com diferentes estruturas químicas DIECKMANN et al. (2001).

A bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* por se destacar na produção dos compostos citados acima é estudada por muitos pesquisadores. WELKER; CAMPBELL (1967) estudando taxonomicamente cepas destes microrganismos classificou-o como bastonetes gram-positivos, esporogênicos e que crescem bem em caldos suplementados em 7% de NaCl. Apresenta perfil bioquímico caracterizado por provocar hidrólise do amido, fermentar sacarose, glicose e lactose, produzir acetimilcarbinol e reduzir nitrito a nitrato. Este microrganismo apresenta o perfil bioquímico bastante semelhante ao do *Bacillus subtilis*, porém pode ser diferir por apresentar um maior percentual molecular das bases Guanina + Citosina do seu DNA e por produzir mais  $\alpha$ -amilase.

A literatura é recheada com pesquisas que apontam cepas de *B. amyloliquefaciens* com atividade antimicrobiana de amplo espectro. Fungos e oomicetos patógenos de plantas foram controlados devido à elevada atividade inibitória da cepa GA1 de *B. amyloliquefaciens*. Além disso, reduziu a infecção pós-colheita de maçãs por *Botrytis cinerea*, agente causador da doença do mofo cinzento. Também apresentou diminuição das doenças nas plântulas pela ação de antibiose direta contra patógenos oriundos do solo, quando foram utilizadas no tratamento de sementes. Os dados sugerem que a cepa GA1 apresenta enorme potencial como agente de biocontrole TOURE et al. (2004); ARGUELLES-ARIAS et al. (2009).

A cepa RC-2 de *B. amyloliquefaciens*, isolada de folhas de amoreira, foi capaz de exercer atividade antifúngica contra o *Colletotrichum dematium* causador da antracnose. Além deste fungo, o filtrado da cultura também inibiu crescimento de outras bactérias e fungos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* e *Rosellinia necatrix*. Foram isolados do cultivo sete tipos de compostos antimicrobianos e o lipopeptídeo iturina A2 foi identificado YOSHIDA et al. (2001).

Por fim, outro trabalho interessante foi realizado com a cepa B94 de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Rhizoctonia solani* e outros fungos fitopatogênicos. Três compostos antifúngicos foram isolados da cultura do microrganismo e identificados como isômeros da iturina A. As iturinas são um grupo de lipopeptídeo cíclicos geralmente produzidos por *Bacillus subtilis* com grande atividade contra fungos. O grupo é formado por iturina A-E, bacilomicina D, F e L e mucosubtilina YU et al. (2002).

### 2.3 Surfactantes de origem microbiana

Os biossurfactantes são compostos ativos que possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica, usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou vários ácidos graxos, podendo estes ser hidroxilados, ramificados, saturados ou insaturados. Esta parte lipofílica é ligada a hidrofílica que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato, aminoácido ou carboidrato. Relatos revelam diversos tipos de biossurfactantes por gêneros de bactérias com base em sua composição química, tais como lipopeptídeos, lipopolissacarídeos, glicolipídeos, oligossacarídeos BANAT et al. (2000). Estas estruturas conferem uma grande variedade de propriedades, incluindo a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos, a formação de

micelas e emulsões entre duas fases distintas SHAHIDZADEH et al. (2000) e RON; ROSENBERG (2001).

Surfactantes de origem microbiana tem recebido uma atenção considerável devido ao seu potencial para reparação de danos ambientais, tais como lavagem de solo, biorremediação, entre outros THAVASI, R.; JAYALASHMI, S; BANAT, IBRAHIM M. (2010). Os mesmos são excelentes agentes de dispersão, podem influenciar positivamente vários processos, pois apresentam baixa toxicidade e alta biodegradabilidade MULLIGAN (2005), SIVAPATHASEKARAN et al. (2010), SATPUTE et al. (2010). Apesar de serem potenciais agentes para todas as aplicações supracitadas, o uso de tais bioprodutos ainda não acontece na prática, necessitando mais estudos para se alcançar uma produção que gere custo benefício podendo assim despertar o interesse e a viabilidade de seu uso.

### **2.3.1 Tipos de biossurfactantes**

Os principais tipos de surfactantes de origem microbiana estão listados na Tabela 2.2. Eles são classificados de acordo com sua natureza química e microrganismo produtor. Segundo BANAT et al. (2000), a produção de biossurfactante é aproximadamente 3 milhões de toneladas por ano.

Como são notórias na tabela acima, as maiores classes de biossurfactantes são: (1) glicolipídeos; (2) lipopolissacarídeos; (3) lipopeptídeos e lipoproteínas; (4) fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros; (5) surfactantes poliméricos DESAI; BANAT, (1997), BUGAY (2012). Os lipopeptídeos são sintetizados por uma ampla gama de gêneros de microrganismos, incluindo principalmente *Pseudomonas* e *Bacillus* NISTSCHKE; PASTORE (2002). Devido à sua excelente capacidade de interagir com a membrana celular, os lipopeptídeos são bastante conhecidos como antimicrobianos, embora na presença de compostos hidrofóbicos passem a agir como poderosos surfactantes exibindo uma ampla gama de atividades.

Tabela 2.2: Principais tipos de biossurfactantes e seus receptivos microrganismos produtores.

TIPOS DE BIOSSURFACTANTES	MICRORGANISMOS PRODUTORES
<b>Glicolipídeos</b>	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>
Soforolipídio	<i>Torulopsis bombicola e</i> <i>T. apicola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis e</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e lipoproteínas</b>	
Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>
Gamicidina	<i>Bacillus Brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Flavolipídios	<i>Flavobacterium MTN11</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispesan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Fonte: Adaptado de MULLICAN (2001), BODOUR et al.,(2004), NITSCHKE; PASTORE (2002).	



O gênero *Bacillus* em particular, são os mais conhecidos, pois produzem lipopeptídeos como iturina, fengicina, surfactina, subtilisina e gramicidina COOPER et al. (1981), NITSCHKE; PASTORE (2002), PERFUMO et al. (2010). Esses surfactantes de origem microbiana são produzidos por *Bacillus subtilis* através de síntese não ribossômica de peptídeos, que segue um mecanismo de linha de montagem, envolvendo intermediários ativos acoplados em regiões específicas de enzimas multifuncionais, produzindo a partir do crescimento microbiano antibiótico e biosurfactantes normalmente excretados para o meio de cultura ETCHEGARAY et al. (2004), ETCHEGARAY et al. (2008).

### 2.3.2 Surfactina

Classificadas como lipopeptídeos do tipo macrolídeos, ácidos, cíclicos, com peso molecular de 1050 kDa. As surfactinas contêm um  $\beta$ -amino ácido graxo (geralmente um ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico, como o ácido 3-hidróxi-13-metiltetradecanóico), ligado ao anel lactona através de uma ponte amida no resíduo de Glutamato e de uma ligação éster no resíduo de D-Leu. A porção hidrofóbica é composta de uma cadeia carbônica variando de  $C_{13}$  a  $C_{15}$  e a porção hidrofílica é composta de Glu – Leu – Leu – Val – Asp – Leu – Leu, disposto na forma de anel peptídico tipo lactona LANG (2002), como pode ser visto na Figura 2.1.

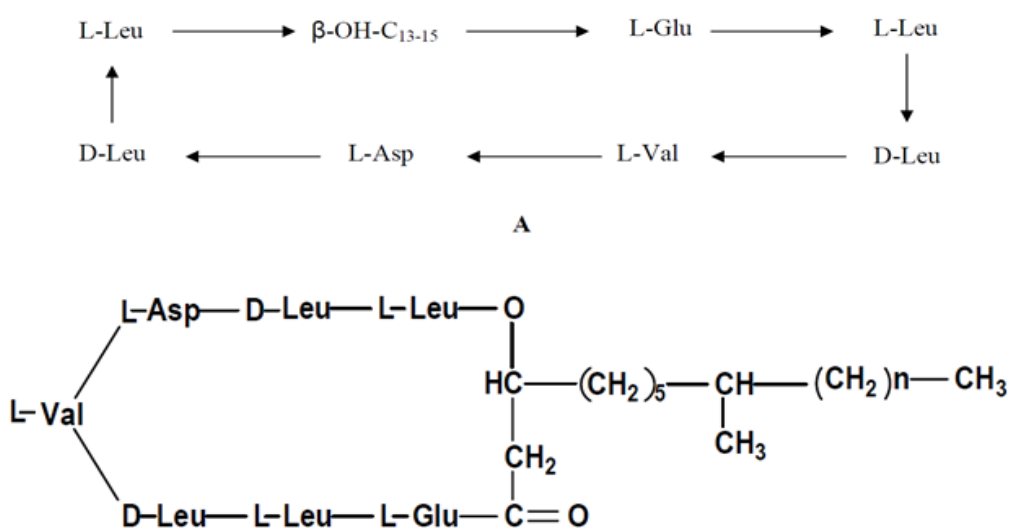


Figura 2.1: Representações molecular do lipopeptídeo Surfactina A (Adaptado de DELEU et al. (1999)).

Conforme visto na Figura 2.1, a Surfactina-A apresenta L-leucina na posição do aminoácido envolvida na formação do anel lactona com ácido graxo de C13-C15. Quando, ao invés de L-Leucina for L-valina ou L-isoleucina, têm-se outras duas novas surfactinas classificadas como Surfactina-B e Surfactina-C, respectivamente CAMEOTRA; MAKKAR (2004).

Este lipopeptídeo tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água a valores inferiores a 30 mN/m, em baixas concentrações, por exemplo 0,005% (m/v) MULLIGAN (2005). Além disso, a surfactina apresenta propriedades tensoativas e emulsificantes que permite o uso nas mais diversas aplicações em diferentes setores industriais, tendo destaque como auxiliar na biorremediação de ambientes poluídos.

As atividades biológicas da surfactina podem ser explicadas por ela possuir grupo de carboxila quelante, conformação flexível do anel lactona e também possuir uma cadeia de ácidos graxos formadoras de micelas VASS et al. (2001). Este lipopeptídeo geralmente sintetizado por *B. subtilis*, possui grande valor comercial na área farmacológica, tem sido descrito como metabólico secundário extracelular KOSARIC (1993), MIRELES et al. (2001). A seguir estão apresentados alguns exemplos vistos na literatura.

Estudos de produção e atividade antimicrobiana de biosurfactantes produzidos por *B. subtilis* C1 revelaram maior eficácia frente a diferentes bactérias Gram-positivas em relação a Gram-negativas VALTER et al. (2002). *B. coagulans*, *Streptococcus mutans*, *B. subtilis* apresentaram maior atividade com halos médios de inibição de 11 mm. Além das bactérias também foram analisadas espécies de leveduras que apresentaram variação na atividade com halos de inibição maiores que 11 mm para *Saccharomyces cerevisiae* e não houve inibição para *Candida albicans*.

A atividade antimicoplasmática pela surfactina foi provada por PAULI et al. (1997). Utilizaram-se um método rápido e simples para a inativação completa e permanente de micoplasma em culturas de células mamárias. Com o tratamento a partir deste lipopeptídeo, houve um aumento na taxa de proliferação celular e mudanças na morfologia das células mamárias as quais tinham sido contaminadas com micoplasma. Além disso, foi observado que a baixa toxicidade da surfactina para as células mamárias permitiu a inativação específica de micoplasma sem deteriorização significativa no efeito do metabolismo celular e na taxa de proliferação das células mamárias.



pela agregação de partículas intramembrana e degradação dos fosfolipídios, liberando eletrólitos e produtos de alto peso molecular. Além disso, aumenta a condutância elétrica da membrana, fato este que incentivou o estudo da capacidade de formação de poros membranares pelos lipopeptídeos CAMEOTRA; MAKKAR (2004).

A eficácia da iturina A contra vários fungos fitopatógenos e leveduras é semelhante ao de pesticidas químicos disponíveis MOYANE et al. (2001), YU et al. (2002) e LIN et al. (2007). Este biocomposto também possui propriedades antibacterianas contra a bactéria fitopatógena *Xanthomonas campestris pv. campestris* ETCHEGARAY et al. (2008).

Propriedades surfactantes e hemolíticas também estão presentes na aplicabilidade da iturina. Potencial pesticida, pois apresenta alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo efeito alergênico em seres humanos e animais PHAE et al. (1992) e LIN et al. (2007).

A surfactina pode atuar sinergicamente com a iturina A aumentando a absorção e estabilidade deste antifúngico na membrana citoplasmática do microrganismo alvo RAZAFINDRALAMBO et al. (1993). O sinergismo desta mistura permite incrementar a atividade hemolítica e antifúngica em até 40% THIMON et al. (1992), RAZAFINDRALAMBO et al. (1993).

#### **2.3.4 Funções e propriedades dos biossurfactantes**

Surfactantes sintetizados por microrganismos podem ser excretados para o meio ambiente, ou podem estar presentes na parede celular do produtor. Vários autores consideram que a célula possuidora da capacidade emulsificante é por si só um biossurfactate, mas apenas os biossurfactantes extracelulares tem o poder de reduzir a tensão superficial de uma fase aquosa.

A função e produção destes compostos estão intimamente relacionadas com a assimilação de hidrocarboneto pelos microrganismos. Entretanto a síntese destes compostos não é somente dependente da atividade do microrganismo e também do processo e condições de produção. Embora função fisiológica exata desta classe de produtos não tenha sido completamente elucidada, algumas delas foram relatadas abaixo LIN (1996), SINGH; CAMEOTRA (2004), VAN HAMME; SINGH; WARD (2006):

- Atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, com destaque para classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. Um grande exemplo de destaque desta seria a surfactina de *B. subtilis*. Através das excretas destes biossurfactantes no meio de cultura, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes NITSCHKE et al. (2004);
- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos: as micelas de biossurfactantes são formadas abaixo da concentração micelar crítica. Elas permitem que os substratos hidrofóbicos se aproximem das células microbianas, propiciando uma interação mais rápida com a membrana celular, resultando na entrega direta do substrato VAN HAMME; SINGH; WARD (2006);
- Transporte de Hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados a parede celular de *Candida tropicalis* NITSCHKE; PASTORE (2002). Esta função foi descoberta quando o microrganismo crescia em alcanos e ocorria um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana. Isto era um indicativo que o complexo polissacarídeo-ácido-graxo presente na superfície celular seria responsável pelo transporte celular.
- Promover a formação, manutenção e a maturação do biofilme: pesquisadores como DAVEY et al. (2003) apud VAN HAMME; SINGH; WARD (2006) mostraram que células de *P. aeruginosa* mutantes no gene *rhlA*, desprovidas da capacidade de produção de ramnolipídios, geram um biofilme anormal, formando um entrelaçamento denso de células.
- Aderência e liberação da célula à superfície: os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular. Buscam aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutriente RON; ROSENBERG (2001).

As várias características apresentadas pelos biossurfactantes, em especial as vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tem despertado o interesse pela busca de seu uso. Diante da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria deles, tais como BOGNOLO (1999), NITSCHKE; PASTORE (2002):

- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica, porém pode ser utilizado em condições drásticas para esses parâmetros. A cepa JF-2 *Bacillus lincheniformis* libera um lipopeptídeo, estável a temperatura de 75 °C por até 140 horas e pH entre 5,0 e 12,0 HOROWITZ et al. (1990). Outro diferencial é o poder de suportar concentrações de 10% de NaCl, enquanto surfactantes sintéticos concentrações salinas de 2 a 3% é capaz de inativá-los NITSCHKE; PASTORE (2006).
- Atividade superficial e interfacial: estes compostos tem a capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores em torno de 30 mN/m ou até mais baixo e a tensão superficial entre a água e n-hexadecano, por exemplo, de 40 mN/m para 1 mN/m DESAI; BANAT (1997), SOBERÓN-CHÁVEZ; MAIER (2011). A atividade do biotensoativo depende da sua concentração em solução até que a concentração micelar crítica (CMC) seja obtida. Em concentração acima da CMC, as moléculas de biossurfactantes associam para formar micelas, bicamadas (lamelas) e vesículas PIRÔLLO (2006). A Figura 2.3 mostra um esquema da relação entre concentração do biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas.

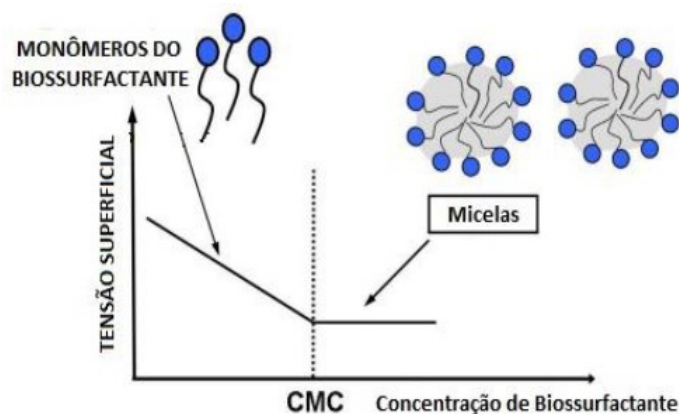


Figura 2.3: : Relação entre a concentração de biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas (WHANG et al. (2008)).

- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, diferentemente dos surfactantes químicos. Tais fatos os tornam adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos MULLICAN (2004).

- Baixa toxicidade: devido à crescente preocupação da população com os efeitos prejudiciais de produtos artificiais, os surfactantes têm recebido uma grande atenção CAMEOTRA; MAKKAR (2004), além disso, sua baixa toxicidade permite sua utilização em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos FLASZ et al. (1998) SINGH; CAMEOTRA (2004).

### 2.3.5 Metodologias para caracterização e quantificação de biossurfactantes

A caracterização de surfactantes produzidos por microrganismos pode ser feita por diversas técnicas. Dentre elas podem ser citadas cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia de massa (EM), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV). Também possuem outras técnicas que determinam as estruturas dos biossurfactantes em tempos curtos e utilizam pouca amostra, são elas: Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz com tempo de Voo (MALDI-TOF) e espectroscopias melhoradas com Bombardeamento de Átomos Rápidos (FAB-MS) BODOUR et al. (2004); FELIX (2012).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em inglês, *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*, apresenta capacidade de separar espécies químicas em misturas complexas. Devido esta grande vantagem, esta técnica analítica de separação é muito utilizada em indústrias químicas, farmacêuticas, laboratórios de análises química e forense, além de vários outros ramos da ciência e pesquisa. A CLAE utiliza colunas fechadas composta de partículas muito finas que proporcionam separações muito eficientes, é essencial para fins qualitativos e quantitativos HARRIS (2005).

Outra técnica utilizada é espectroscopia FTIR, uma variação da espectroscopia IR. Seu princípio de funcionamento é utilização de um feixe infravermelho que atravessa a amostra e detecta grupos funcionais expressos em vibrações moleculares. Estes grupos refletem características químicas e bioquímicas da substância analisada. A FTIR apresenta vantagens como maior rapidez, alta reprodutibilidade e alta razão sinal/ruído. Desta forma, constitui-se uma análise não destrutiva ZENG et al. (2007), SKORNYAKOV et al. (2008).

A Espectrometria de Massa (EM), em inglês Mass Spectrometry (MS), tem grande destaque por ser uma técnica micro analítica utilizada para receber informações do peso molecular e de características estruturais das amostras avaliadas. Na prática a

detecção por EM pode ser realizada em dois modos distintos: varrimento total, onde são monitorados todos os íons fragmentados formados e o modo de íons pré-selecionados. Este último pode ser reconhecido por Selected Ion Recording (SIR) ou Selected Ion Monitoring (SIM), nele apenas são monitorados os íons previamente considerados para a caracterização BORGES (2007). Ela é considerada uma das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis para o meio científico. É capaz de fornecer diversas informações sobre a composição elementar das amostras, estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e composição de superfícies sólidas, dentre outras (Espectrometria de Massas, 2013).

Na literatura podem-se encontrar vários trabalhos que utilizaram essas técnicas. OLIVEIRA et al. (2013) caracterizou um biossurfactante produzido por cepas de *Bacillus* utilizando técnicas de CLAE e FTIR. FELIX (2012) em estudo de caracterização do biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* utilizou técnicas de FTIR, EM e Espectroscopia de Massas de Alta Resolução (EMAR), para elucidação do biotensoativo produzido. PEREIRA et al. (2013) em estudo de otimização de produção destes bioprodutos utilizaram técnicas de FTIR, EM e RMN para caracterização do biossurfactante de interesse.

### 2.3.6 Exemplos de aplicações dos biossurfactantes

Conforme visto anteriormente, estes compostos apresentam ação específica, por isso são preferencialmente indicados para uso em aplicações mais particulares ou nobres SINGH; VAN HAMME; WARD (2007). Diante disso, amplia-se a possibilidade de uso dos compostos tensoativos microbianos, destacando-se as áreas agrícola, médica, indústria farmacêutica e têxtil BERTRAND et al. (1994). A Tabela 2.3 apresenta de forma resumida algumas aplicações de biossurfactantes reportados da literatura.

MIRELEIS et al. (2001) estudando o uso da surfactina em cateteres, conseguiram resultados importantes contra infecções causadas por espécie de *Salmonella*. Estes pesquisadores fizeram um pré-revestimento do cateter com solução de surfactina antes da inoculação com meio, e verificaram que esta foi tão eficiente quanto adicionar surfactina no meio de crescimento. Este biossurfactante tem ação de reduzir o biofilme formado por estes patógenos em cateteres uretrais de vinil.



Tabela 2.3: Possíveis aplicações em diversos setores industriais.

<b>Função do Biossurfactante</b>	<b>Campo de Aplicação</b>
Recuperação de óleo residual, recuperação da viscosidade de óleos	Petrolífera
Bactericida, antifúngico e antiviral	Farmacêutica, agrícola
Limpeza	Alimentícia, petrolífera, cosmética e química em geral
Solubilização	Alimentícia, comética, farmacêutica, papel, textil
Emulsificante	Alimentícia, cosmética, têxtil, curtumes, petrolífera, plásticos
Detergentes e formadores de espuma	Curtumes, produtos agrícolas, indústria química e metalúrgica
Agente umectante	Têxtil, metalúrgica e cosmética
Lubrificante	Têxtil e metalúrgica
Agentes permeabilizadores	Farmacêutica, têxtil e química
Estabilizante	Têxtil
Agente dispersante	Papel e petrolífera
Sequestrante de metais	Biorremediação e tratamento de Resíduo
Removedor de cera de furtas e vegetais	Alimentícia
Ligação do asfalto à areia e cascalho	Construção civil

Fonte: SINGH et al., (2007), NITSCHKE; PASTORE, (2002), KOSARIC et al., (1987).

Acidentes com derramamento de produtos de derivados do petróleo se tornaram numerosos e isso causa problemas ecológicos e sociais. Devido a ação dos biossurfactantes aumentarem a interação superficial Água/Óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de água e solos BANAT, (1995) e MULLICAN, (2004). Estes compostos podem ser usados

diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo.

Um processo alternativo é o seu uso na limpeza de reservatórios de óleos. Resíduos e frações de óleos pesados sedimentam no fundo de reservatórios de estocagem são altamente viscosos e podem tornar-se depósito de sólidos que não conseguem ser removidos pelo bombeamento convencional. O uso de surfactantes de origem microbiana promove a diminuição na viscosidade e a formação da emulsão óleo /água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão BANAT et al. (1991); MULLIGAN (2004).

Na indústria de alimentos a emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase na solubilização de aromatizantes BANAT et al. (2000). Os agentes tenso-ativos encontram aplicação em panificação e produtos derivados de carne, influenciando as características reológicas da farinha e emulsificação de gorduras VATER, (1986); NITSCHKE; PASTORE, (2002).

Devido sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes têm aplicação em produtos de higiene e cosméticos NITSCHKE; PASTORE (2002), destacando-se também no setor farmacêutico. Um produto comercial que continha 1 mol de soforolipídios e 12 moles de propilenoglicol, apresentou ótima compatibilidade dérmica, sendo utilizado em cremes faciais YAMANE (1987), NITSCHKE; PASTORE (2002).

Os surfactantes microbianos podem ser usados na agricultura em formulações de herbicidas e pesticidas. Estes produtos por possuem compostos ativos hidrofóbicos em suas formulações são necessários o uso de agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas LIN (1996). Surfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis PATEL; GOPINATHAN (1986) e NITSCHKE; PASTORE (2002).

Portanto, conforme pode ser visto nesta gama de aplicabilidades, espera-se que em poucos anos o mercado dos biossurfactante detenha 10% do mercado dos surfactantes sintéticos. Também é esperado que a venda do bioproduto chega no montante de 200 milhões de dólares HESTER, (2001) e MULLICAN (2005).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismo

Para a realização deste trabalho foi utilizado uma linhagem do *Bacillus amyloliquefaciens*. Este microrganismo registrado pelo National Germplasm Repository foi fornecido pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha – Lallemand, localizado na cidade de Patos de Minas – MG.

A identificação do microrganismo conforme a Figura 3.1 foi feita através de um marcador molecular RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR). A cepa foi identificada como IT45 CNCM I-38000. A Figura 3.2 mostra identificação do IT45 realizada por microscópio de varredura.

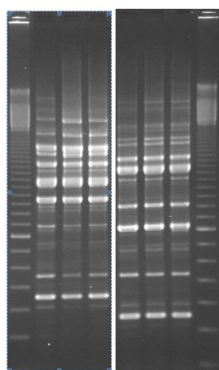


Figura 3.1: Impressão digital RAPD-PCR da cepa IT45.  
(Fonte: Laboratório de Biocontrole Farroupilha - Lallemand)

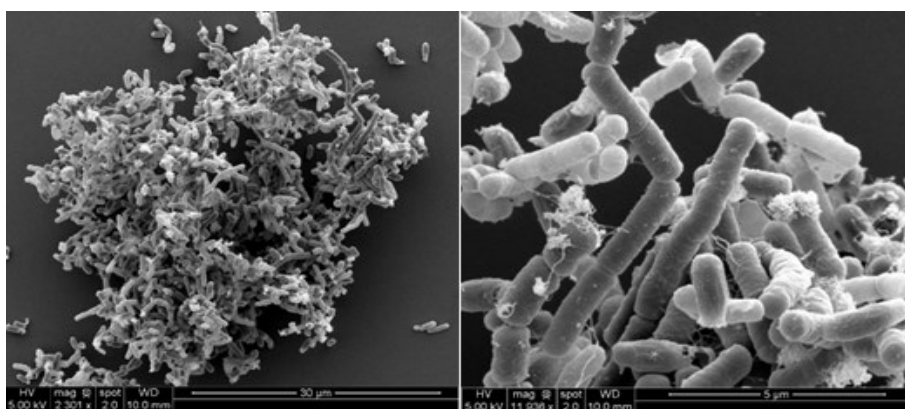


Figura 3.2: Identificação da cepa por microscópio de varredura.  
(Fonte: Laboratório de Biocontrole Farroupilha - Lallemand)

### 3.2 Preservação em solo estéril

Muitas bactérias podem ser preservadas por anos em solo estéril. A grande vantagem deste método é minimizar a probabilidade de variabilidade genética já que não há crescimento significativo durante o período de armazenamento. É importante ressaltar que o solo é uma comunidade biológica extremamente diversificada e sua esterilização demanda cuidados especiais.

A metodologia consiste em pegar o solo, peneirá-lo em peneira de malha 2 mm, dispensar 8 gramas solo peneirado em frascos de vidros que suportam altas temperaturas. Esterilizar os frascos por uma hora a 170 °C, repetir este passo no segundo e terceiro dia com intervalos de 24 horas, a fim de garantir a esterilização. Preparar a suspensão bacteriana de interesse, transferir de 1,5 a 2,0 mL da suspensão em cada frasco contendo solo, resultando 15 a 20% de umidade, ter o cuidado de não encharcar o mesmo. Homogeneizar o conteúdo do frasco com auxílio de um palito de madeira estéril. Retirar uma amostra do frasco e repicar pelo método de estrias, para observar se existe contaminação e incubar a 28-30°C. Após 24 horas fazer um novo teste para avaliar a contaminação e armazenar em freezer.



Figura 3.3: Material preservado.

### 3.3 Meios de cultivo

#### 3.3.1 Meio de reativação

Para reativação do IT45, introduziu o solo preservado contendo o microrganismo em placas já preparadas anteriormente com meio de cultura LBC, meio adaptado a partir do TSA (trypticase soy agar) pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha. Este procedimento foi desenvolvido em Câmaras de Fluxo previamente esterilizadas com álcool 70% e luz germicida

A placa contendo o microrganismo foi levada para uma estufa à 28°C por 20 horas, tempo necessário para crescimento e formação das células vegetativas. Após este período o IT45 era utilizado para inóculo.

Para reativação dos fungos usados no ensaio de Atividade Antimicrobiana da seção 4.4, foi utilizado o meio de cultura BDA – Batata Dextrose Ágar.

### 3.3.2 Meio para crescimento de *Bacillus*

Esta etapa teve o objetivo de definir o meio a ser otimizado. Foram testados dois meios de culturas o BR08 e o FR08. O primeiro, composto de sacarose, extrato de levedura, fosfato de potássio entre outros reagentes e o segundo, meio selecionado para otimização, está descrito na Tabela 3.1.

Primeiramente foi preparado o inóculo, seu procedimento consiste em espalhar uma porções de solo contendo o microrganismo preservado em 6 placa de petri (diâmetro 9 cm). Após esta etapa as placas foram levadas para estufa a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Depois de incubadas, as placas foram “lavadas” e uma suspensão bacteriana com concentração de  $2.8 \times 10^8 \text{ CFU.mL}^{-1}$ , foi formada. Inoculou-se 1 mL desta solução bacteriana concentrada em 500 mL de meio de cultura previamente esterilizados. Posteriormente estes erlenmeyers de 1L foram levados para um shaker à temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  e agitação de 180 rpm por 48 horas.

Tabela 3.1: Composição do meio de cultura para crescimento de *Bacillus sp.*

Reagentes Meio FR08	Concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ )
Xarope de Glicose	30,00
Extrato de Levedura	20,00
Cloreto de Cálcio	8,00
Sulfato de Cobre	0,004

### 3.3.3 Definição das faixas de estudo para desenvolvimento do Planejamento Composto Central

Na Tabela 3.2 estão as concentrações dos reagentes com o objetivo de definir faixas de concentrações para o desenvolvimento do Planejamento Composto Central. Inicialmente todos os meio de cultura tiveram seus pH corrigidos para 6,80 e esterilizados por 25 minutos a 121°C em autoclave. A concentração da suspensão bacteriana foi  $4,00 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>, na qual 2 mL desta foi inoculada em 500 mL de meio de cultivo anteriormente preparado. As condições de trabalho do shaker foram temperatura de 30 °C e agitação de 180 rpm.

Tabela 3.2: Avaliação das concentrações de xarope de glicose, de extrato de levedura e de cloreto de cálcio para a definição das faixas do Planejamento Composto Central.

Tratamentos	Xarope de glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	Cloreto de cálcio (g.L <sup>-1</sup> )
Tr 1	30	20	8
Tr 2	5	20	8
Tr 3	30	10	8
Tr 4	5	10	8
Tr 5	10	10	2

## 3.4 Sistema experimental utilizado

### 3.4.1 Ativação do microrganismo

A ativação foi realizada através do repique da cultura, anteriormente preservada e acondicionada em freezer, em placas de Petri contendo meio LBC. O procedimento consiste em espalhar uma porção do solo contendo o microrganismo em placa de Petri de diâmetro 9 cm, para que o crescimento seja homogêneo por toda região. Após esta etapa as placas foram levadas para estufa a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  por 20 horas.

### 3.4.2 Fermentação em mesa agitadora

Primeiramente foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar a influência do recipiente e quantidade de meio de cultura, no crescimento de biomassa celular e açúcar residual, visando uma maior disponibilidade de oxigênio para os microrganismos. Os tratamentos foram realizados em 2 recipientes diferentes, erlenmeyers de 2L e em garrações de 5L. Para aumentar a coluna de oxigênio no interior dos frascos foi decidido usar 10% do seu volume útil de cada recipiente, então nos erlenmeyers de 2L utilizou-se 200 mL e nos garrações de 5L utilizou-se 500 mL de meio de cultura, a Tabela 3.3 ilustra as condições testadas neste ensaio.

Todos os tratamentos foram feitos em duplicatas e os meio de cultura tiveram seus pH corrigidos para 6,80 e esterilizados por 25 minutos à 121°C em autoclave. Depois de inoculado a concentração inicial de células foi de  $4,8 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup>, em cada recipiente. As condições de trabalho do shaker foram temperatura de 30°C e agitação de 200 rpm.

Tabela 3.3: Avaliação de tratamentos para estudo de recipiente fermentativo.

Tratamentos	Recipiente	Acesso de O <sub>2</sub>
Tr1	Garração (5L)	Facilitado*
Tr2	Garração (5L)	Restrito**
Tr3	Erlenmeyer (2L)	Restrito
Tr4	Erlenmeyer (2L)	Facilitado

Facilitado\*: quando não lacrou o recipiente com papel filme.

Restrito\*\*: quando lacrou o recipiente com papel filme.

Depois de definidas as faixas de concentração do xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio e também o recipiente fermentativo, foi desenvolvido o Planejamento Composto Central mostrado na Tabela 3.4. Este planejamento foi proposto em 3 níveis com 3 repetições no ponto central e 3 variáveis (extrato de levedura marca Biorigin, xarope de glicose da marca Glucodry e cloreto de cálcio), foram estudadas. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata, totalizando 34 tratamentos. O  $\alpha$  utilizado foi de rotabilidade e o seu valor absoluto foi 1,682. Os valores reais e codificados das variáveis foram determinados após os resultados obtidos em testes preliminares. Os valores de xarope de glicose – Glucodry (X1) estavam em g.L<sup>-1</sup>: 3,18 (- $\alpha$ ), 10,00 (-1), 20,00 (0), 30,00 (+1), 36,82 (+ $\alpha$ ); os valores de extrato de

levedura – Biorigin (X2) utilizados em g.L<sup>-1</sup> foram 6,60 (-  $\alpha$ ), 10,00 (-1), 15,00 (0), 20,00 (+1), 23,40 (+ $\alpha$ ) e cloreto de cálcio (X3) em g.L<sup>-1</sup> 0,0 (- $\alpha$ ), 2,0 (-1), 5,0 (0), 8,0 (+1), 10 (+ $\alpha$ ).

Tabela 3.4: Concentrações dos reagentes proposta pelo Planejamento Composto Central.

Tratamentos	X1 (g/L)	X2 (g/L)	X3 (g/L)
1	10,00	10,00	2,00
2	10,00	10,00	8,00
3	10,00	20,00	2,00
4	10,00	20,00	8,00
5	30,00	10,00	2,00
6	30,00	10,00	8,00
7	30,00	20,00	2,00
8	30,00	20,00	8,00
9	3,18	15,00	5,00
10	36,82	15,00	5,00
11	20,00	6,60	5,00
12	20,00	23,40	5,00
13	20,00	15,00	0,00
14	20,00	15,00	10,00
15	20,00	15,00	5,00
16	20,00	15,00	5,00
17	20,00	15,00	5,00

As fermentações foram realizadas em mesa agitadora industrial com 36 repartições confeccionada exclusivamente para garrações de capacidade de 5 litros, conforme a Figura 3.4. Para a realização dos ensaios, 500 mL de meio de cultivo foram distribuídos nos garrações. Ajustou-se o pH do meio de cultivo a ser fermentado para 6,80 e esterilizou-se a 121,5°C por 25 minutos.

Testes preliminares foram realizados para verificar a eficácia da esterilização, obtendo-se resultados positivos para crescimento, então a citada condição de esterilização foi adotada. Adicionou-se aos meios de cultivo 1 mL de suspensão bacteriana referente a fase de ativação, contendo concentração igual a  $1,5 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Depois de preparado, os garrações com concentração inicial de  $3,0 \times 10^5$  CFU. mL<sup>-1</sup> foram incubados por 48 horas em uma sala com temperatura mantida a 30°C e 200 rpm.





Figura 3.4: Mesa agitadora industrial.

### 3.4.3 Fermentação em biorreator

Os cultivos realizados em biorreatores iniciam-se com o preparo do inóculo. Após a etapa de reativação, lavou-se a placa contendo o microrganismo com 5 mL de água estéril, obtendo-se uma suspensão bacteriana. Esta suspensão foi introduzida em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura anteriormente autoclavados a 121,5°C por 25 minutos. Os frascos foram mantidos em um agitador shaker com movimento orbital (Ethik, modelo 190-2) a uma agitação de 180 rpm e temperatura igual a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 20 horas.

O preparo do Fermentador se deu com a completa lavagem do seu vaso, filtros de ar e água. Posteriormente foi feita a esterilização do biorreator somente com água para limpeza das correntes do processo e eliminação de possíveis resíduos de microrganismos provenientes de outras fermentações. Essa esterilização inicial ocorreu a 121,5°C por 15 minutos, depois a água de seu interior foi descartada e 24 litros do meio de cultura com  $\text{pH } 7,5 \pm 0,2$  foi introduzido no biorreator para ser esterilizado. O processo de esterilização se repete, porém com tempo de esterilização do meio de cultivo de 25 minutos. É importante salientar que durante a esterilização o pH reduz, chegando a dar uma diferença de até 1,2 do seu valor inicial, portanto o pH inicial da fermentação foi de  $6,5 \pm 0,2$ .

Após a etapa de preparação do inóculo e esterilização, 100 mL do caldo fermentado, rico em células vegetativas, foi inoculado no biorreator (Mobile Pilot Plant Fermentor, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) de capacidade 40 litros, fabricado em 1988. A concentração do inóculo variou de  $5,0 \times 10^7$  a  $4,0 \times 10^8$  CFU/mL

e as condições de processo foram temperatura igual  $30 \pm 0,1$  °C, agitação de 250 rpm e aeração variando na faixa de 0,5 a 1,5 vvm. Para o controle da espuma usou-se anti-espumante siliconado da marca Silaex. A Figura 3.5 mostra a planta piloto descrita anteriormente e a Tabela 3.5 mostra as concentrações do inoculo e dos reagentes testados de cada tratamento.

Tabela 3.5: Concentrações do meio de cultura e inoculo para fermentação em biorreator.

<b>Tratamentos</b>	<b>Inoculo (CFU.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Xarope de glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Extrato de levedura (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cloreto de cálcio (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Fermentação 1</b>	$1,5 \times 10^8$	3,5	15	2
<b>Fermentação 2 a</b>	$5,0 \times 10^7$	20	15	2
<b>Fermentação 2 b</b>	$4,4 \times 10^8$	20	15	2
<b>Fermentação 3</b>	$1,2 \times 10^8$	25	15	2
<b>Fermentação 4 a</b>	$1,62 \times 10^8$	30	20	8
<b>Fermentação 4 b</b>	$2,9 \times 10^8$	30	20	8



Figura 3.5: Planta Piloto utilizada.

### **3.5 Métodos analíticos**

#### **3.5.1 Viabilidade celular**

Procedimento também conhecido como contagem em placa, utilizado para estimar o número de colônia de células viáveis, isto é, capazes de se reproduzir em uma amostra. A metodologia, fornecida pelo Laboratório de Biocontrole Farroupilha – Lallemand envolve a coleta de alíquotas de uma cultura microbiana em diferentes tempos de crescimento, as quais são transferidas para o meio LBC sólido, de composição especificada anteriormente. Após a incubação à 28°C por 18 horas, tempo ideal de crescimento do IT45, o número de colônias é contado fornecendo o resultado em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL<sup>-1</sup>). Como uma colônia normalmente é originada a partir de um organismo, o total de colônias que se desenvolvem no meio corresponde ao número de células viáveis presentes na alíquota analisada. Esta técnica deve ser realizada empregando-se várias diluições (10<sup>1</sup> a 10<sup>12</sup> células) das amostras. A contagem de células viáveis pode ser feita pela semeadura em superfície ou em profundidade ("pour plate"). Neste trabalho foi realizado semeadura em superfície, pelo fato do microrganismo ser aeróbio. Uma curva de calibração foi criada para acompanhamento do crescimento celular em tempos intermediários, ela se encontra no Anexo.

Diante da realidade deste trabalho, para alguns ensaios houve a necessidade de quantificação apenas de esporos viáveis, para isto, é feito um procedimento térmico com o caldo fermentado, a fim de inativar as células vegetativas. O procedimento consiste em diluir 1 mL da amostra em 9 mL de água destilada estéril, depois é feito o aquecimento a 80°C por 12 minutos em um Banho Maria. Depois deste período faz-se o procedimento descrito acima, porém agora são quantificados apenas esporos viáveis.

#### **3.5.2 Determinação de glicose, maltose e açúcar residual**

A determinação da glicose e maltose foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Amostras foram retiradas de tempos em tempos, e o consumo foi quantificado através de uma curva de calibração de um padrão de Glicose e Maltose comprado da empresa Sigma-Aldrich. O processo cromatográfico consiste na partição

dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. A amostra foi diluída, filtrada e injetada no sistema cromatográfico, marca Shimadzu, modelo LC-20<sup>a</sup> Prominence, coluna SUPELCOGEL, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A solução de arraste utilizada foi água deionizada, o fluxo de bomba 0,5 mL/min, temperatura do forno de 80°C e volume de injeção de 20 microlitros.

Devido à fonte de carbono ser complexa (xarope de glicose é constituído de glicose, maltose, maltotriose e polissacarídeos totais), também foi realizado a análise de açúcares residuais totais. O açúcar residual total foi fornecido percentualmente baseando no somatório das áreas dos picos cromatográficos que reduziam ao longo da fermentação pela Equação 3.2:

$$AR(\%) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n P_i}{\sum_{i=1}^n P_{i0}} \times 100 \quad (3.2)$$

Sendo:

$AR(\%)$  = Percentual de açúcar residual total;

$\sum_{i=1}^n P_i$  = Somatório das áreas dos picos referente ao ponto final da fermentação;

$\sum_{i=1}^n P_{i0}$  = Somatório das áreas dos picos referente ao ponto inicial da fermentação.

### 3.5.3 Tensão superficial

Para análise da tensão superficial, utilizou-se 10 mL da amostra da solução aquosa livre de células do caldo fermentativo. O método utilizado foi o descrito por Du Noüy (1925), com o tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemanha), à temperatura ambiente. A calibração foi executada com álcool etílico, realizando posteriormente uma divisão do valor padrão pelo valor real. Este fator de correção foi multiplicado com o valor da tensão obtida da amostra.

### 3.5.4 Biossurfactantes totais

A concentração de biossurfatante foi calculada usando caldo fermentado livre de células pelo método gravimétrico descrito por ZHI et al., (2017). Primeiramente 20 mL

do caldo fermentado foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O pH destas amostra livre de células foi ajustado para 2,0 utilizando HCl na concentração de 6 M. Esta solução resultante foi mantida “overnight” na geladeira por 15 horas para completa precipitação e depois centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos. O biossurfactante total foi calculado depois de remover o sobrenadante e secar o decantado em estufa à 40°C até a massa permanecer constante. A concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi calculada subtraindo a massas do tubo de Falcon depois da secagem, com massa do tudo de Falcon inicial e dividido por 20 mL, volume da amostra coletada inicialmente.

### **3.5.5 Atividade antimicrobiana**

A atividade do antagonismo contra fungos foi determinada pelo método de difusão em meio sólido. Em placa de Petri de 90 mm de diâmetro com três repartições foram adicionados 20 mL de meio de cultura BDA para o crescimento do microrganismo teste. Depois da placa vertida, discos contendo o fungo patogênico foram introduzidos em uma das extremidades e as placas foram incubadas em Câmara Incubadora BOD à 25°C por 48 horas. Depois deste período, em uma das repartições da placa, discos de papel de porosidade definida e previamente autoclavados foram saturados com 20  $\mu\text{L}$  do caldo fermentado livre de células de concentração  $2,5 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>. A outra repartição da placa, o disco de papel também foi saturado com 20  $\mu\text{L}$  com o produto de extração de concentração  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ , visto no item 3.5.4. As placas foram levadas novamente à câmara incubadora à 25°C por 96 horas. A atividade foi expressa como o diâmetro do halo de inibição em torno do disco, expresso em milímetros (mm).

## **3.6 Caracterização e quantificação da Surfactina**

### **3.6.1 Precipitação e extração**

Para a extração do biossurfactante, centrifugou-se o caldo fermentado por 20 minutos a uma rotação de 10.000 rpm para separação da biomassa. Antes da remoção das células ajustou-se o pH do caldo fermentado para 7,0 com o objetivo de evitar possíveis perdas do bioproduto juntamente com as células microbianas na centrifugação, uma vez que o surfactante precipita em pH ácido. Para a extração e

posteriormente quantificação do biossurfactante produzido, ajustou-se o pH de 20 mL do sobrenadante livre de células para 2,0 com HCl 3M. O meio acidificado foi deixado em repouso por 15 horas na geladeira a 4°C para formação do precipitado. Após esse período, centrifugou-se as amostras por 20 minutos a 10.000 rpm para recuperação do biossurfactante. Suspendeu-se o precipitado rico no bioproduto em 8,0 mL de água deionizada e ajustou-se o pH para  $8,0 \pm 0,2$ , por ser a melhor condição encontrada para completa diluição do precipitado. Posteriormente adicionou-se o mesmo volume de cloreto de metileno para realizar a extração líquido-líquido. Agitou-se a solução por 5 minutos, deixou-se em repouso por 2 horas para separação do produto recolhendo em seguida em um Becker de 100 mL. Este procedimento foi repetido mais 2 vezes para melhor recuperação do produto. O solvente foi evaporado em capela química e o bioproduto foi posteriormente suspenso em 20 mL de metanol para quantificação em CLAE.

### **3.6.2 Análise cromatográfica para Surfactina**

Determinou-se a concentração de Surfactina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com sistema cromatográfico marca Shimadzu, modelo LC-20<sup>a</sup> Prominence, acoplado com detector UV e equipado com coluna de fase reversa Symmetry C18 (150 x 4.6 mm, 5µm, Waters, Irlanda). Utilizou-se fase móvel composta por 20% de solução de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80% de acetonitrila na vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> a 30 °C. O volume de injeção foi de 20 µL e o tempo de análise de 20 minutos conforme descrito por WEI; CHU (1998). A Surfactina foi identificada usando detector UV, com comprimento de onda de 205 nm.

### **3.6.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformadas de Fourier (FTIR) do biossurfactante produzido pelo *Bacillus amyloliquefaciens* IT45**

Com objetivo de caracterização, os espectros vibracionais na região do vermelho foram obtidos a partir de amostras do caldo fermentado bruto livre de células e também com o produto depois da precipitação ácida, utilizando a técnica FT-IR Spectrometer modelo Spectrum TWO marca PerkinElmer. Foi usado o padrão de Surfactina comprado da empresa Sigma Aldrich com 98% de pureza, como referência.

A análise de espectroscopia vibracional na região do infravermelho do surfactante produzido pelo *B. amyloliquefaciens* IT45 foi realizada em um equipamento PerkinElmer – Spectrum TWO, Acumulação: 100 scans; Resolução: 2  $\text{cm}^{-1}$ ; Janela espectral: 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; Detector: TGS (triglycine sulfato).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Testes preliminares

Os testes preliminares tiveram papel importante nos resultados adquiridos, pois com eles pode-se conhecer melhor o microrganismo, bem como o melhor ambiente e condições para seu desenvolvimento.

#### 4.1.1 Seleção de meio de cultura para produção do *Bacillus amyloliquefaciens* IT45

Os resultados referentes ao crescimento celular e produção de biossurfactante total depois de 48 horas de fermentação, são mostrados na Tabela 4.1. Para cada meio testado foram realizadas três fermentações (triplicatas) e as condições de processo foram reportadas na seção 3.3.2.

Tabela 4.1: Resultados dos Testes Preliminares 1 – Escolha do Meio de Cultivo.

Tratamentos	Biossurfactantes ( $\text{g.L}^{-1}$ )	Concentração celular ( $\text{CFU.L}^{-1}$ )
T1 BR08*	5,40	$8,80 \times 10^7$
T2 BR08*	4,20	$7,70 \times 10^7$
T3 BR08*	3,90	$9,60 \times 10^7$
T4 FR08**	4,45	$1,87 \times 10^8$
T5 FR08**	4,32	$1,53 \times 10^8$
T6 FR08**	5,12	$1,48 \times 10^8$

(\*) Tratamentos referentes às fermentações do meio BR08.

(\*\*) Tratamentos referentes às fermentações do meio FR08

O meio de cultivo definido para ser aperfeiçoado foi o FR08, pois apresentou crescimento celular de aproximadamente 46% superior, na média. As concentrações de biossurfactante apresentaram valores próximos na média, sendo  $4,50 \pm 0,79 \text{ g.L}^{-1}$  para o meio BR08 e  $4,63 \pm 0,43 \text{ g.L}^{-1}$  para o meio FR08. Outro fator decisivo foi às altas porcentagens do açúcar residual para o meio FR08, apresentando valores superiores a 70%, indicando a possibilidade de algum dos reagentes estarem em excesso.

#### 4.1.2 Estudo de condições para desenvolvimento do Planejamento Composto Central

Esta etapa teve o objetivo de definir faixas de concentrações para três variáveis, xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio, para desenvolvimento do Planejamento Composto Central. Como resposta, foi avaliado o açúcar residual e crescimento celular utilizando o meio de cultura FR08.

Todos os tratamentos foram realizados em duplicatas, as condições de processo estão citadas na seção 3.3.3. A Figura 4.1 mostra o perfil cinético de crescimento celular, onde se fez uma média das repetições para cada tratamento. Analisando os gráficos, com exceção do tratamento número 5 (Tr 5), o crescimento atingiu a ordem de grandeza  $10^8 \text{ CFU.mL}^{-1}$ . Porém tanto para baixas quanto para altas concentrações de xarope de glicose e extrato de levedura o número de células final chegou a valores muito próximos e baixos, se comparado com a literatura.

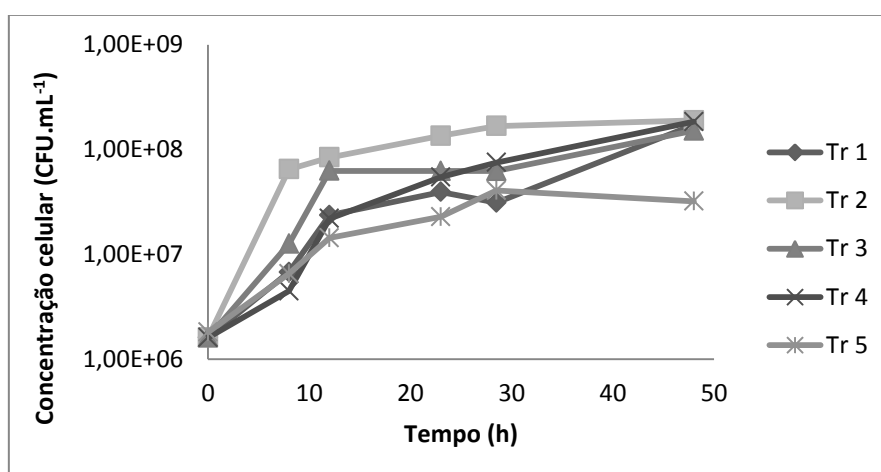


Figura 4.1: Perfil cinético do crescimento celular.



A Figura 4.2 mostra o baixo consumo da fonte de carbono. Os altos valores de açúcar residual e baixo para o crescimento celular pode ser explicado pela falta de oxigênio, por exemplo.

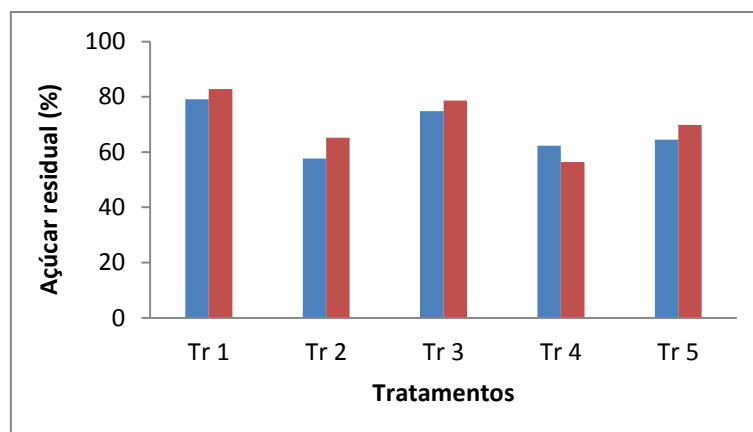


Figura 4.2: Açúcar residual. Barra azul referente ao Ensaio 1 e barra vermelha referente ao Ensaio 2.

YAN et al. (2017) estudando atividade de hidrólise de algumas cepas de *Bacillus* para produção de Surfactina, conseguiram número de célula de  $1,16 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> para uma co-cultura das cepas MT45 e X27 de *Bacillus amyloliquefcien*s. As condições de trabalho do shaker foram temperatura de 30°C e agitação de 160 rpm, porém utilizaram erlenmeyers de 500 mL onde uma suspensão bacteriana de concentração  $5,0 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> foi inoculada em 100 mL de meio de cultura. No presente trabalho foram utilizados erlenmeyes de plástico com volume útil de 1L e 500 mL de meio de cultura, a coluna de ar interna pode não ser satisfatória para este parâmetro. O oxigênio é muito importante para o desenvolvimento de *Bacillus* porque são microrganismos extremamente aeróbios. O próximo passo, estudado no item 4.1.3, é descobrir qual o melhor volume de meio de cultura e recipiente fermentativo, visando uma maior coluna de ar.

#### 4.1.3 Estudo de recipiente fermentativo para fermentação em mesa agitadora

Esta etapa teve o objetivo de avaliar a influência do recipiente e quantidade de meio de cultura a se fermentar, visando uma maior disponibilidade de oxigênio para os microrganismos. Os tratamentos foram realizados em 2 recipientes diferentes, erlenmeyers de 2L e em garrações de 5L. Para aumentar a coluna de oxigênio no interior

dos frascos foi decidido usar 10% do seu volume útil de cada recipiente, então nos erlenmeyers de 2L utilizou-se 200 mL e nos garrações de 5L utilizou-se 500 mL de meio de cultura.

Todos os tratamentos foram realizados em duplicatas, a Figura 4.3 mostra o perfil cinético de crescimento celular, onde se fez uma média das repetições para cada tratamento. Analisando os gráficos, o crescimento aumentou significativamente se comparado com os resultados da seção 4.1.2. O tratamento 4 (Tr4) teve o maior crescimento celular sendo  $1,4 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> em seguida veio o tratamento 1 (Tr1) com  $9,6 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> e o tratamento que teve menor desempenho foi o de número 2 (Tr2) com  $3,1 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Então, é notório que a coluna de oxigênio no interior do recipiente, bem como o acesso de oxigênio externo contribuiu para o aumento do crescimento celular.

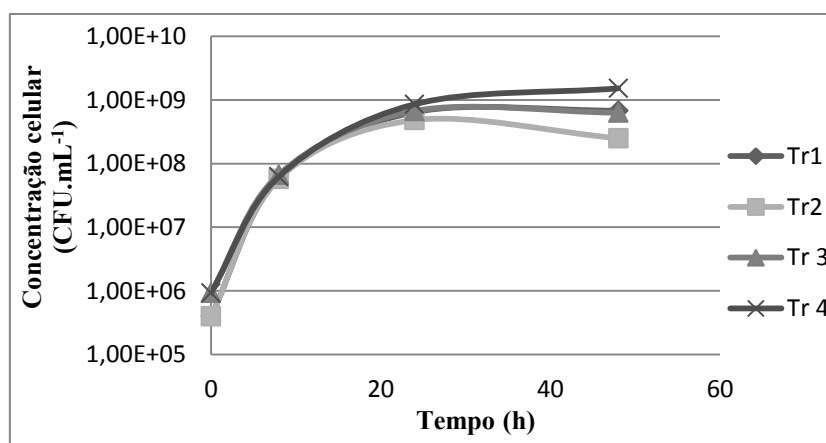


Figura 4.3: Perfil cinético de crescimento para ensaio de definição de recipiente fermentativo.

A Figura 4.4 mostra o açúcar residual de cada repetição dos tratamentos, em relação às análises da seção 4.1.2 o açúcar residual reduziu, era de se esperar, pois tivemos um crescimento celular maior para todos os tratamentos. Estes valores percentuais continuam altos, por isso será proposto um Planejamento Composto Central para aperfeiçoar a concentração dos reagentes presentes no meio de cultura com o objetivo de reduzi-los. Portanto foi definido que para a realização das fermentações do Planejamento Composto Central será utilizado os garrações de 5L com 500 mL de meio de cultura, sem a presença de papel filme para facilitar a entrada de oxigênio, pois a mesa agitadora industrial foi desenvolvida para esses recipientes e o volume interno de

500 mL é suficiente para fazer as amostragens necessárias para as análises, mantendo 70% do volume inicial da fermentação.

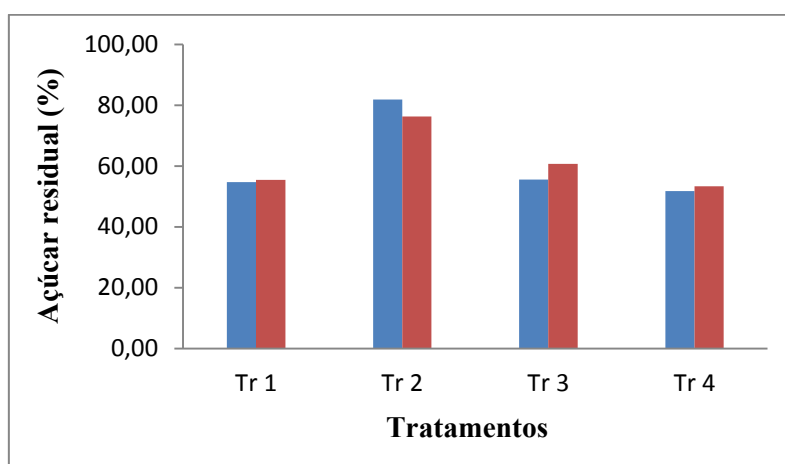


Figura 4.4: Açúcar residual do ensaio de definição de recipiente fermentativo. Barra azul referente ao Ensaio 1 e barra vermelha referente ao Ensaio 2.

#### 4.2 Produção de biossurfactante por *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 em mesa agitadora

Os tratamentos foram realizados em uma mesa agitadora industrial com 36 divisões feitas exclusivamente para as garrafas de 5 litros, procedimento descrito na seção 3.4.2. Um Planejamento Composto Central (PCC) foi elaborado com intuito de maximizar a produção de biossurfactante pela cepa IT45. Este planejamento foi proposto em 3 níveis com 3 repetições no ponto central e 3 variáveis foram estudadas: extrato de levedura, xarope de glicose da marca Glucodry e cloreto de cálcio. Todos os tratamentos foram realizados em duplicatas, totalizando 34 tratamentos.

As respostas analisadas foram biossurfactantes totais (BST), tensão superficial (TS) e açúcar residual (AR) e todos os dados estatísticos foram calculados utilizando o StatSoft Software Statistica 7.1. A Tabela 4.2 mostra todos os resultados.

Tabela 4.2: Concentrações das variáveis proposta pelo Planejamento Composto Central e resultados das respostas.

Tratamentos	X1 (g/L)	X2 (g/L)	X3 (g/L)	TS (mN/m)	AR (%)	BST (g/L)
1	(-1) 10.00	(-1) 10.00	(-1) 2.00	37.03	30.02	2.62
2	(-1) 10.00	(-1) 10.00	(+1) 8.00	43.28	38.66	1.18
3	(-1) 10.00	(+1) 20.00	(-1) 2.00	28.37	34.52	2.76
4	(-1) 10.00	(+1) 20.00	(+1) 8.00	37.98	48.39	1.34
5	(+1) 30.00	(-1) 10.00	(-1) 2.00	34.60	45.94	3.68
6	(+1) 30.00	(-1) 10.00	(+1) 8.00	44.24	53.02	0.46
7	(+1) 30.00	(+1) 20.00	(-1) 2.00	26.90	48.00	4.30
8	(+1) 30.00	(+1) 20.00	(+1) 8.00	34.10	67.12	3.14
9	(-α) 3,18	(0) 15.00	(0) 5.00	34.60	51.43	1.38
10	(+α) 36,82	(0) 15.00	(0) 5.00	28.90	67.45	4.44
11	(0) 20,00	(-α) 6.60	(0) 5.00	38.94	40.80	0.51
12	(0) 20,00	(+α) 23.40	(0) 5.00	33.70	51.76	0.73
13	(0) 20,00	(0) 15.00	(-α) 0.00	29.30	32.22	4.83
14	(0) 20,00	(0) 15.00	(+α) 10.00	40.40	50.34	2.07
15	(0) 20,00	(0) 15.00	(0) 5.00	29.00	32.08	5.90
16	(0) 20,00	(0) 15.00	(0) 5.00	28.00	31.03	5.44
17	(0) 20,00	(0) 15.00	(0) 5.00	26.00	30.09	5.52

#### 4.2.1 Avaliação da Tensão Superficial frente à suplementação do meio de cultivo

A resposta tensão superficial (TS) foi analisada pelos dados da Tabela 4.2 e pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.5. Após análise estatística dos resultados experimentais tem-se a Equação Codificada 4.1, com 90% de confiança:

$$TS\left(\frac{\text{mN}}{\text{m}}\right) = 27.59 - 1.20X_1 + 1.67X_1^2 - 2.98X_2 + 3.30X_2^2 + 3.78X_3 + 2.83X_3^2 \quad (4.1)$$

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,93, o que indica que cerca de 93% dos dados experimentais foram conformes ao modelo. Os valores negativos de X1 e X2 mostram que maiores concentrações de xarope de glicose e extrato de levedura diminuem a resposta de tensão superficial, podendo ser observado na Tabela 4.2 com os tratamentos 1 e 7, por exemplo. A variável X3 (cloreto de cálcio) possui o maior efeito

na equação pelo fato de possuir maior coeficiente, para menores concentrações de X3 tem-se uma menor tensão superficial, também pode ser exemplificado comparando os tratamentos 1 e 2 ou pelos tratamentos 7 e 8, por exemplo, na Tabela 4.2.

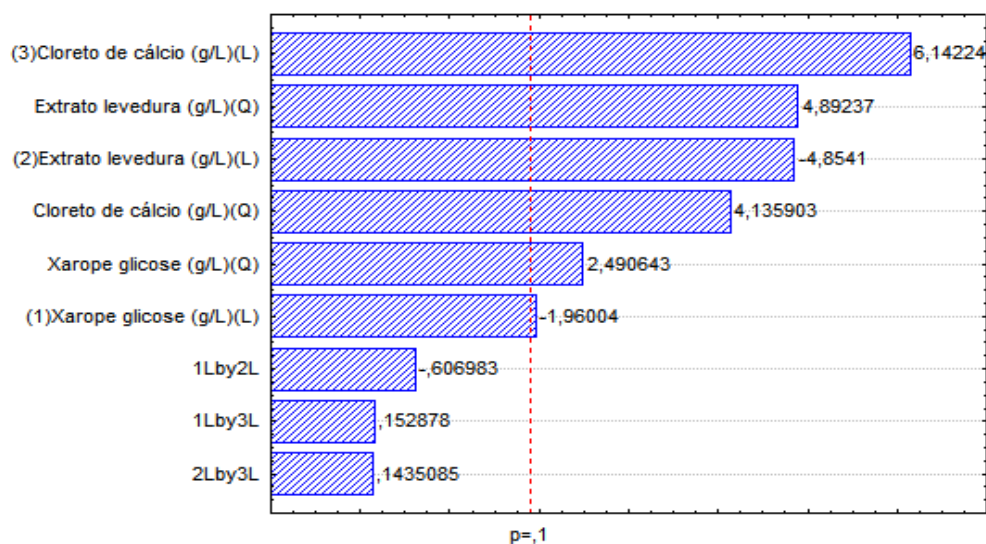


Figura 4.5: Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para tensão superficial.

A Figura 4.6 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências o que indica variância constante para todos os valores da resposta.

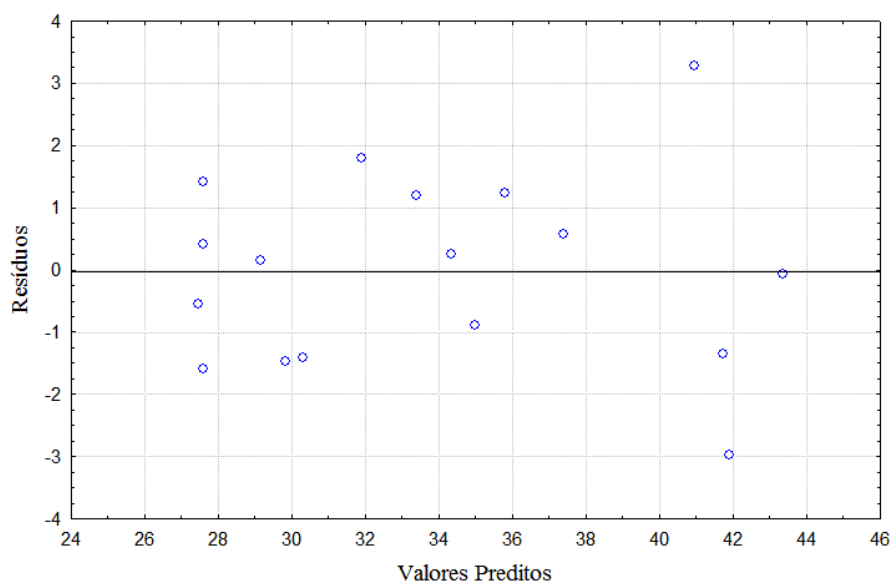


Figura 4.6: Distribuição dos resíduos relativos à tensão superficial.

A Figura 4.7 mostra a distribuição dos valores preditos em função aos valores observados, nela é possível notar a proximidade dos valores observados com os valores preditos. Tal fato indica que o modelo é apropriado para análise dos dados.

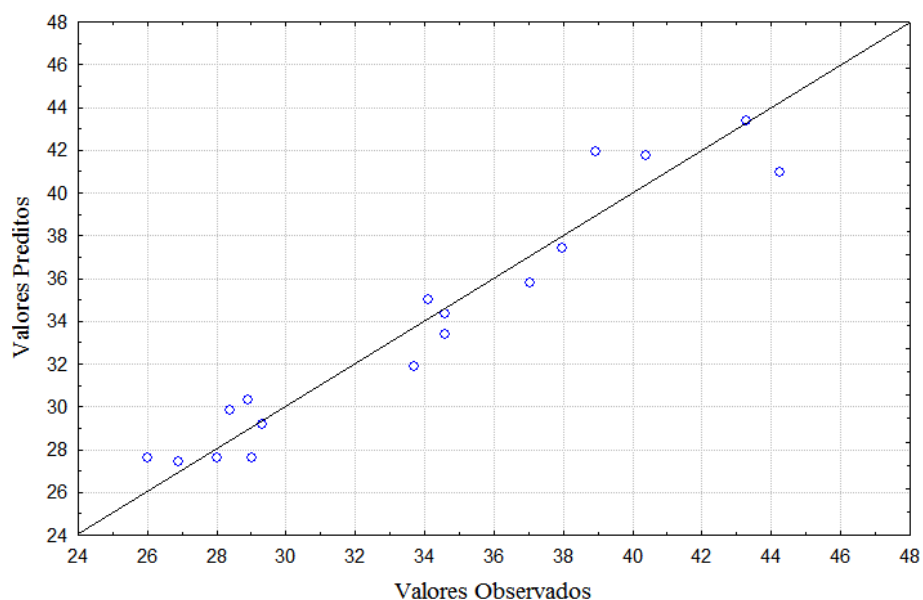


Figura 4.7: Valores preditos em função dos valores observados relativos à tensão superficial.

Os melhores resultados observados em relação a minimizar a tensão superficial foram para a concentração de xarope de glicose na faixa de 20 a 27 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura na faixa de 15,5 a 18,5 g.L<sup>-1</sup> e cloreto de cálcio na faixa de 2 a 4 g.L<sup>-1</sup>, como pode ser observado nas Figuras 4.8 a 4.13.

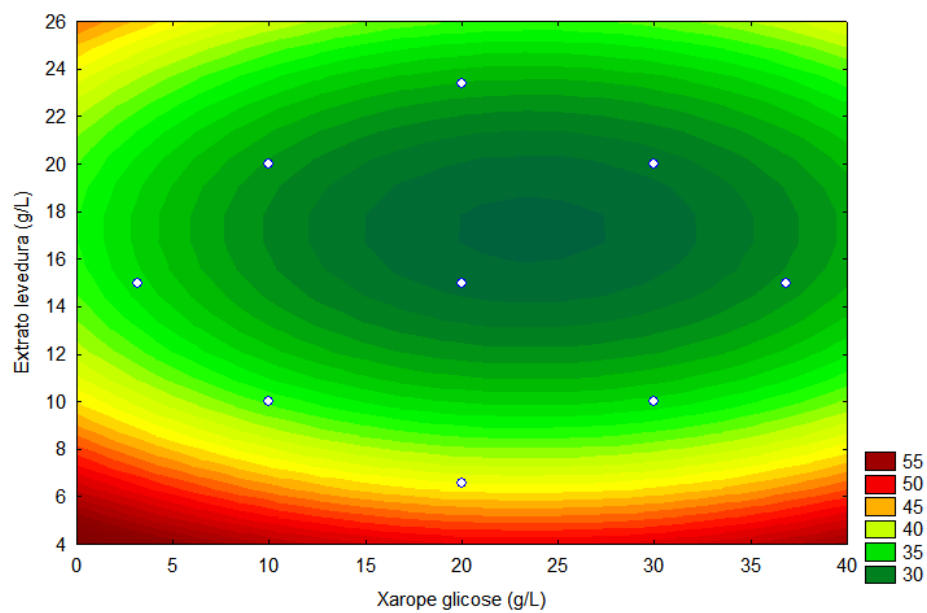


Figura 4.8: Curva de contorno para concentrações de extrato de levedura e xarope de glicose na redução da tensão superficial.

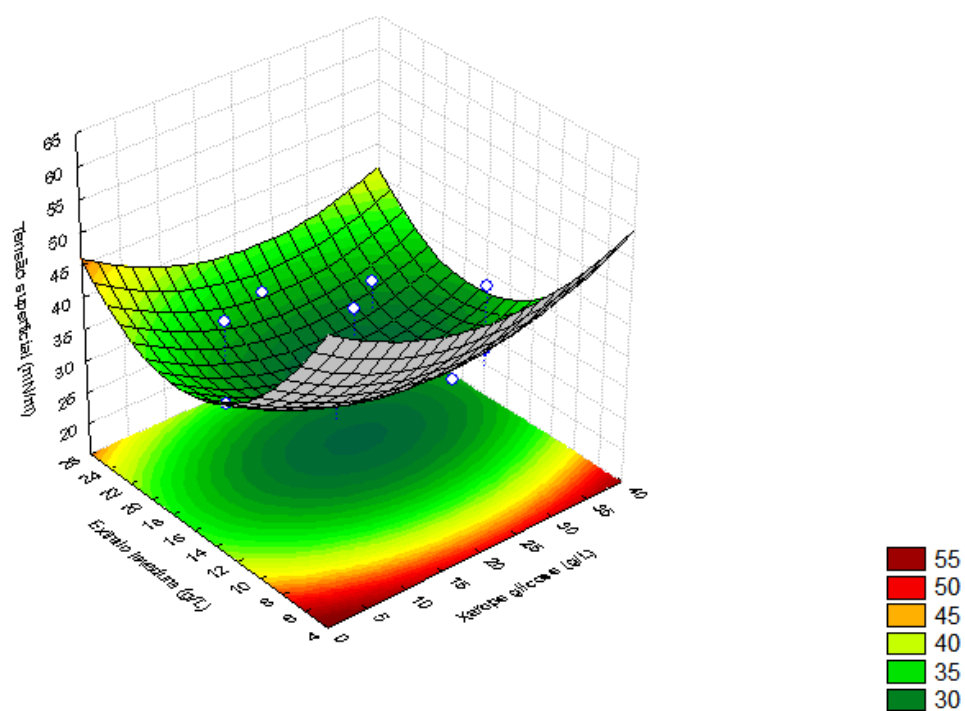


Figura 4.9: Superfície de resposta para tensão superficial em relação ao extrato de levedura e xarope de glicose.

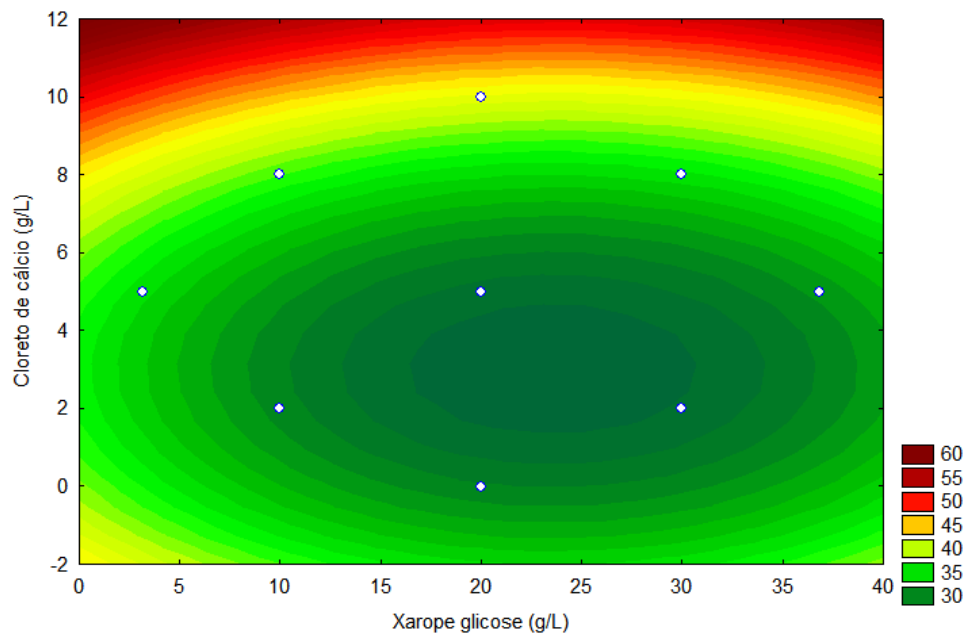


Figura 4.10: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e xarope de glicose na redução da tensão superficial.

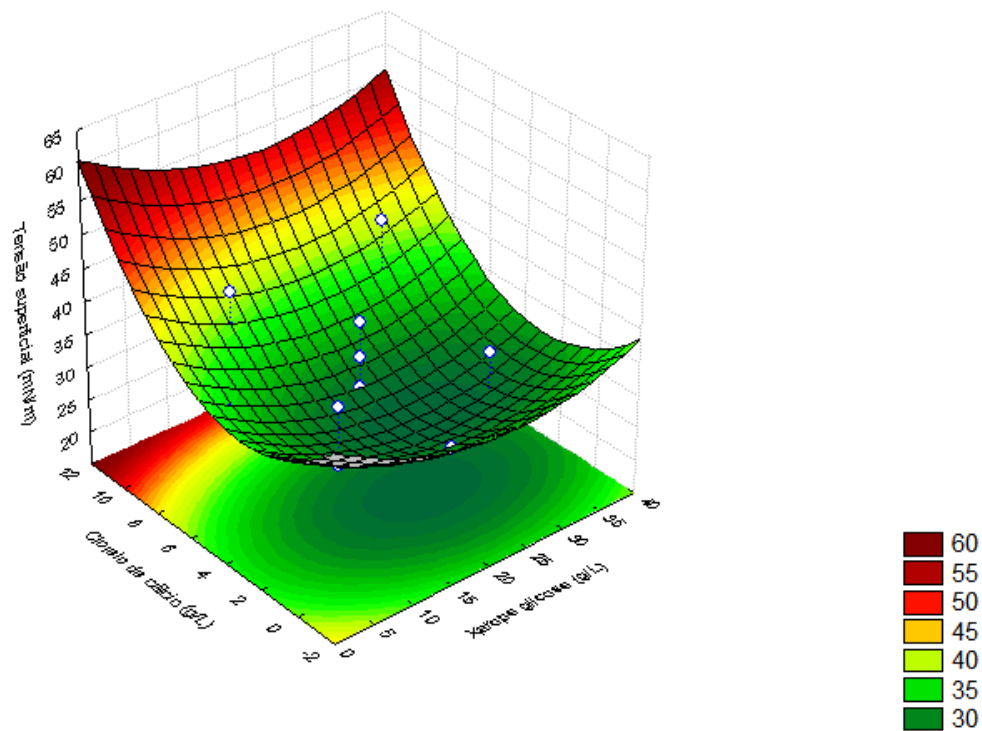


Figura 4.11: Superfície de resposta para tensão superficial em relação ao cloreto de cálcio e xarope de glicose.



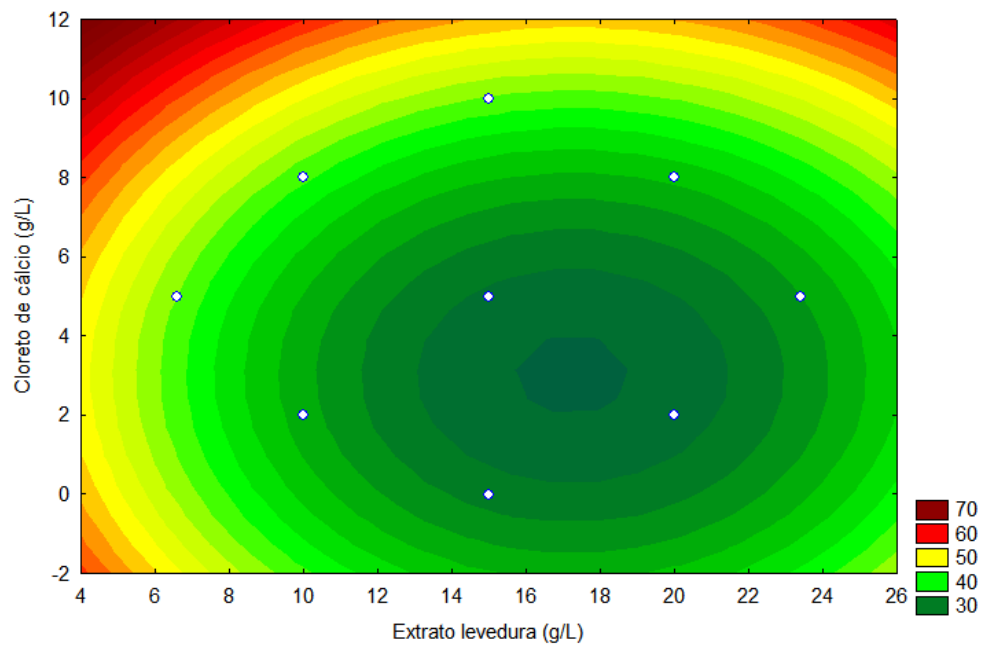


Figura 4.12: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e extrato de levedura na redução da tensão superficial.

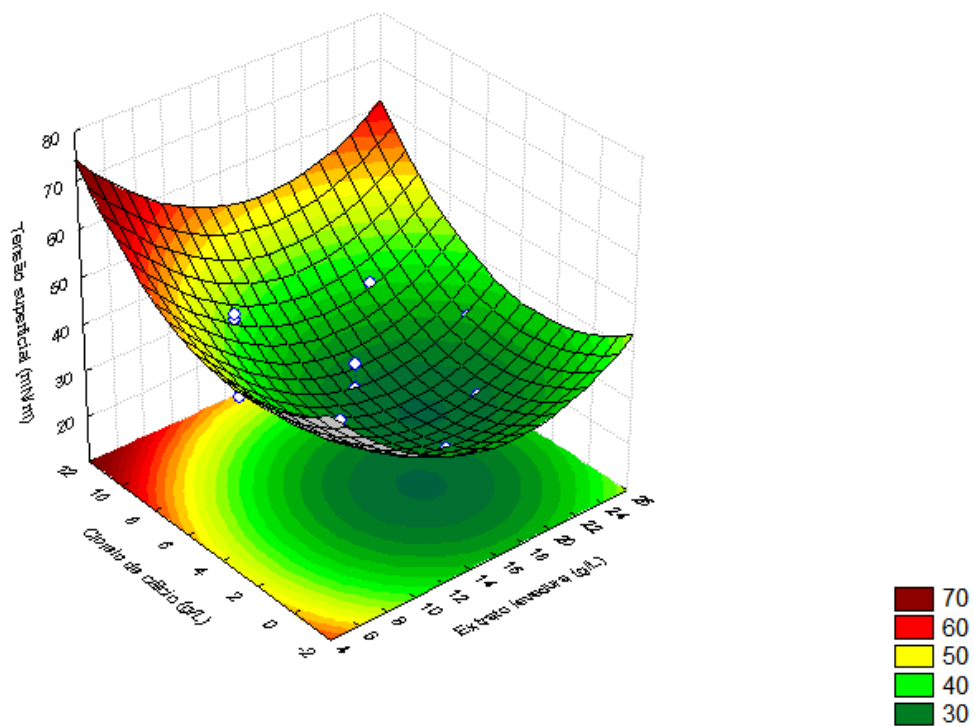


Figura 4.13: Superfície de resposta para tensão superficial em relação ao cloreto de cálcio e extrato de levedura.

Quando estes parâmetros estão nestes intervalos, a tensão superficial do meio de cultura é reduzida de valores acima de 50 mN/m para 30 mN/m após um período de 48 horas. Esta significativa redução da tensão superficial evidencia a produção de agentes superficiais durante a fermentação. A diminuição pode ser explicada pela produção de metabólitos secundários, como biossurfactantes, por exemplo.

RADHIKA et al. (2014) utilizando *B. amyloliquefaciens* USTBb com meio de sal mineral (MSM) proposto por CHANDANKERE et al. (2013) e condições do processo de 180 rpm e temperatura de 37° C foi capaz de reduzir a tensão superficial de 62 para 28 mN/m, depois de 48 horas de processo. A mínima tensão superficial foi observada no meio da fase exponencial de crescimento celular (24 horas), depois deste período não houve mudanças significantes em tal valor.

FERNANDES (2006) no seu estudo de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* cepa R14 observou uma redução de 54 mN/m no início do crescimento para 30 mN/m após 20 horas de cultivo. Este mesmo biossurfactante, após 52 horas de cultivo, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 29.89 mN/m. MULLIGAN (2004) descreveu que um bom surfactante deve ser capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m. Portanto pode-se concluir que o surfactante produzido está dentro dos padrões sugeridos por este autor.

#### **4.2.2 Avaliação do consumo de substrato frente à suplementação do meio de cultivo**

Devido à fonte de carbono ser um produto complexo (Xarope de glicose) composto de glicose, maltose, maltotriose e polissacarídeos totais, foi realizado a análise de açúcar residual (AR) para avaliar o consumo de substrato. O AR foi fornecido percentualmente baseando no somatório dos picos cromatográficos que reduziam ao longo da fermentação utilizando a equação descrita no item 3.5.3.

A resposta do (AR) foi analisada pelos dados da Tabela 4.2 e pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.14. Após análise estatística dos resultados experimentais tem-se a Equação Codificada 4.2, com 90% de significância:

$$AR (\%) = 31.65 + 6,55X_1 + 8,95X_1^2 + 3,58X_2 + 4,30X_2^2 + 5,82X_3 + 2,58X_3^2 \quad (4.2)$$

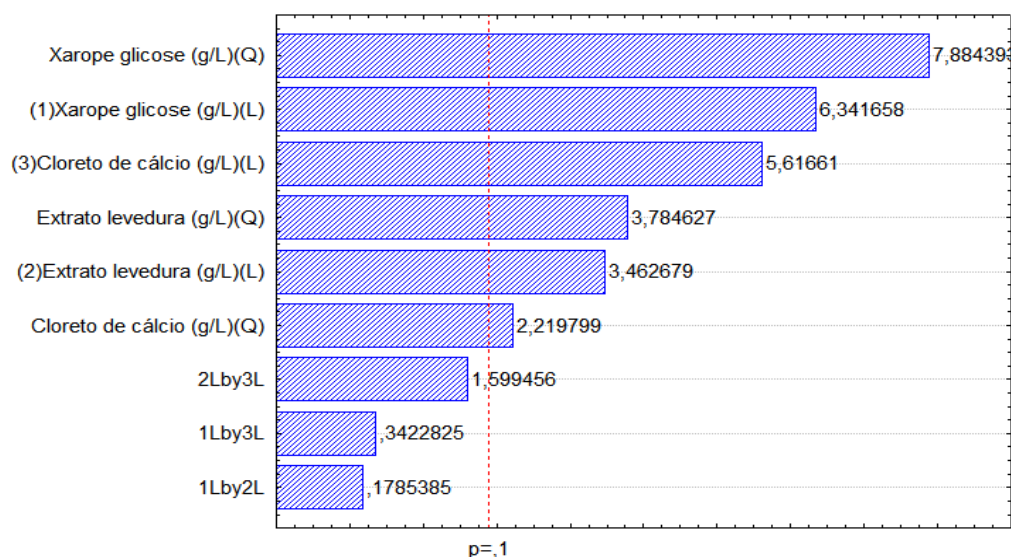


Figura 4.14: Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para açúcar residual. **indicando**

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de aproximadamente 0,94, o que indica que cerca de 94% dos dados experimentais estão de acordo com o modelo. A Figura 4.15 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências o que indica variância constante para todos os valores da resposta.

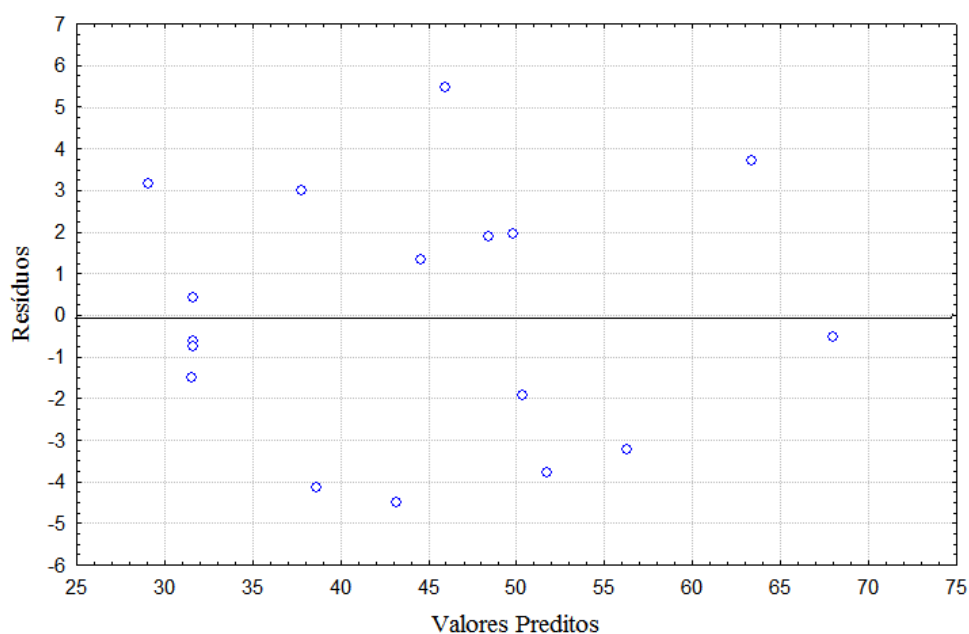


Figura 4.15: Distribuição dos resíduos relativos ao açúcar residual.

A Figura 4.16 mostra a distribuição dos valores preditos em função aos valores observados, nela é possível notar a proximidade dos valores observados com os valores preditos. Indicativo que o modelo é apropriado para análise dos dados.

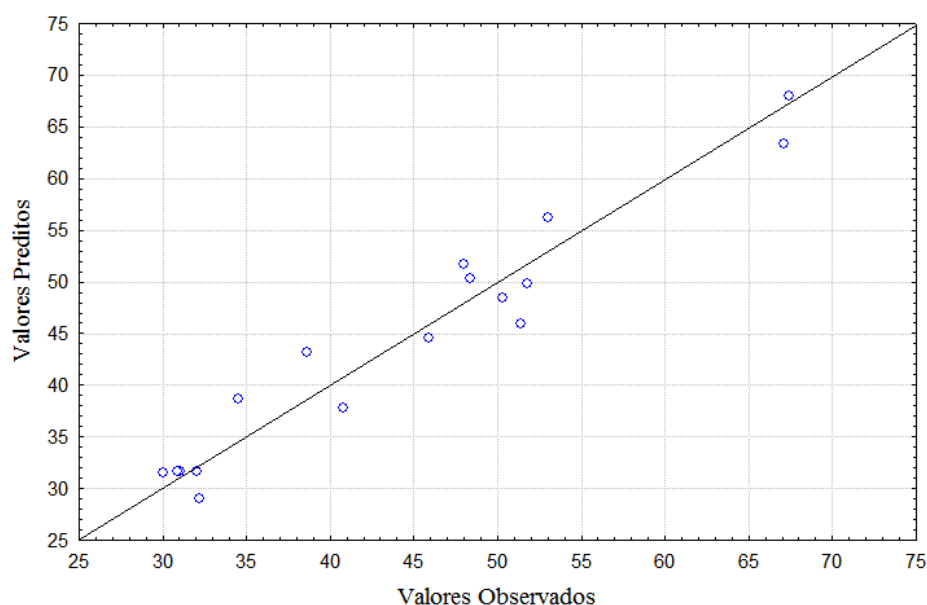


Figura 4.16: Valores preditos em função dos valores observados relativos ao açúcar residual.

Os valores positivos de X1, X2 e X3 mostram que maiores concentrações de xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio aumentam a resposta de açúcar residual, ou seja, ficam mais açúcares no meio de cultura sem ser consumido pelo microrganismo, tal fato pode ser visto através dos tratamentos 1 e 8, na Tabela 4.2. A variável de maior influência é o X1 (xarope de glicose), pois ela possui o maior coeficiente em módulo. Para exemplificar tal influência tem-se os tratamentos 2 e 6, em que o extrato de levedura e cloreto de cálcio são mantidos constantes e o xarope de glicose aumenta de 10 g.L<sup>-1</sup> no tratamento 2 para 30 g.L<sup>-1</sup> no tratamento 6, a resposta ao açúcar residual aumenta de 38,66% para 53,02%, conforme visto na Tabela 4.2.

Os melhores resultados observados foram para as faixas de concentração: 14-20 (g.L<sup>-1</sup>) de xarope de glicose, 12-15 (g.L<sup>-1</sup>) de extrato de levedura e 1-3 (g.L<sup>-1</sup>) de cloreto de cálcio. As Figuras 4.17 a 4.22 ilustram estes valores.

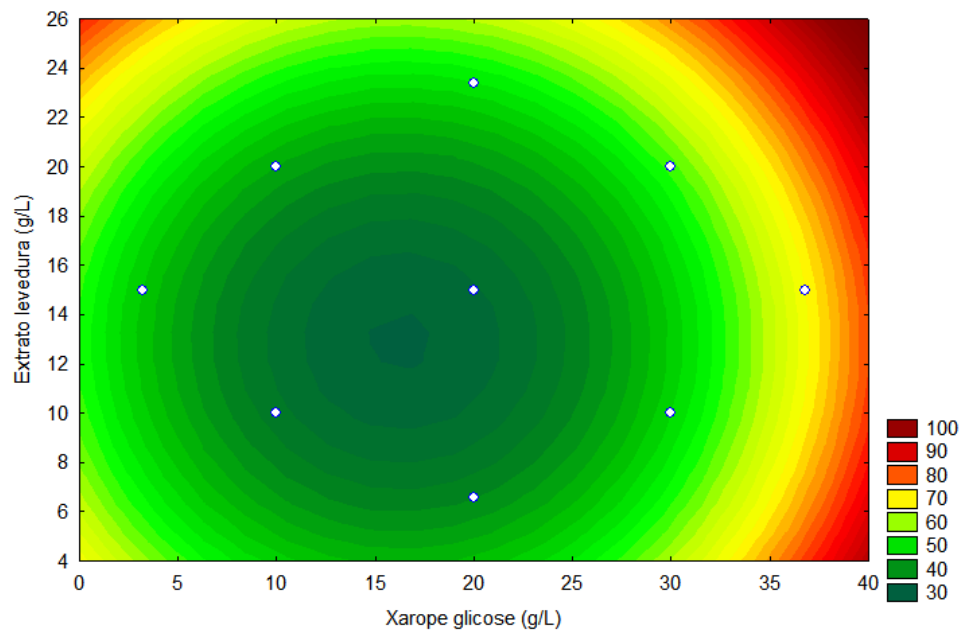


Figura 4.17: Curva de contorno para concentrações de extrato de levedura e xarope de glicose objetivando a redução do açúcar residual.

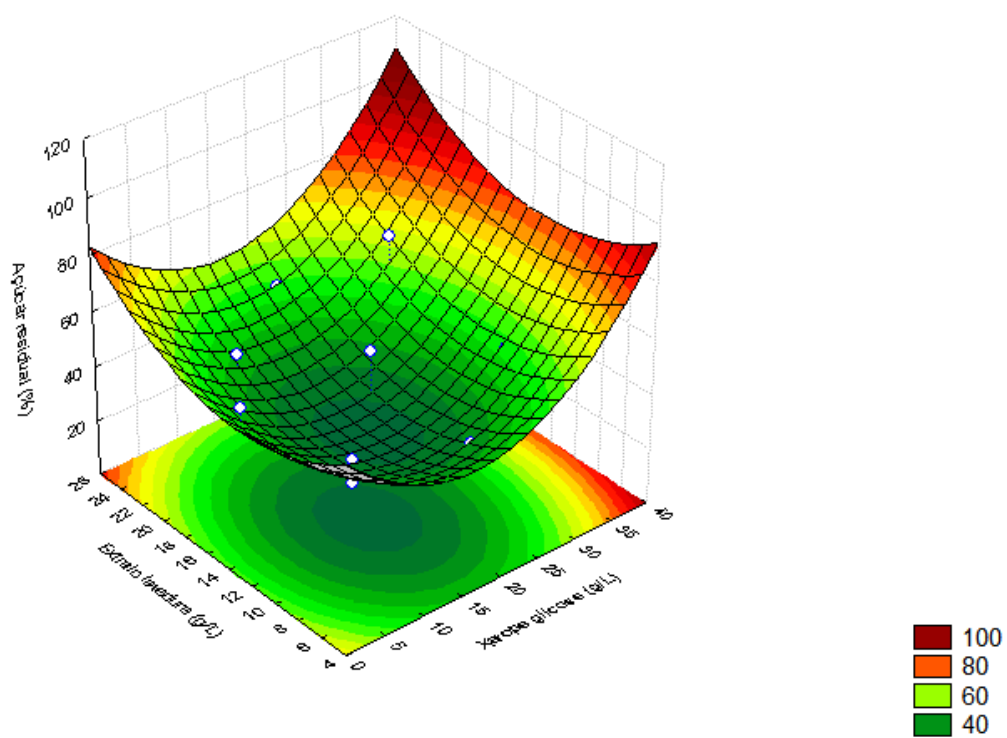


Figura 4.18: Superfície de resposta para açúcar residual em relação ao extrato de levedura e xarope de glicose.

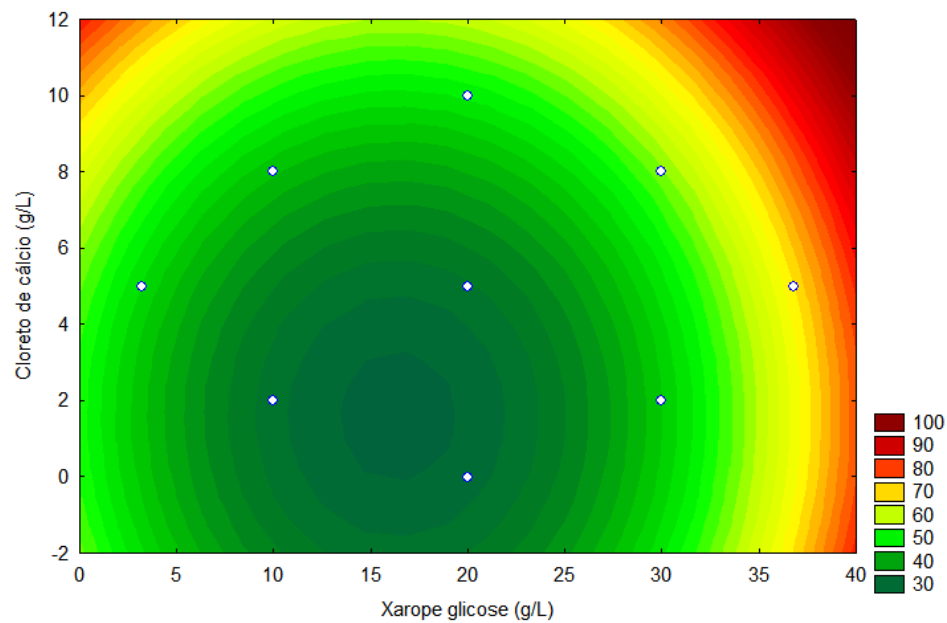


Figura 4.19: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e xarope de glicose objetivando a redução do açúcar residual.

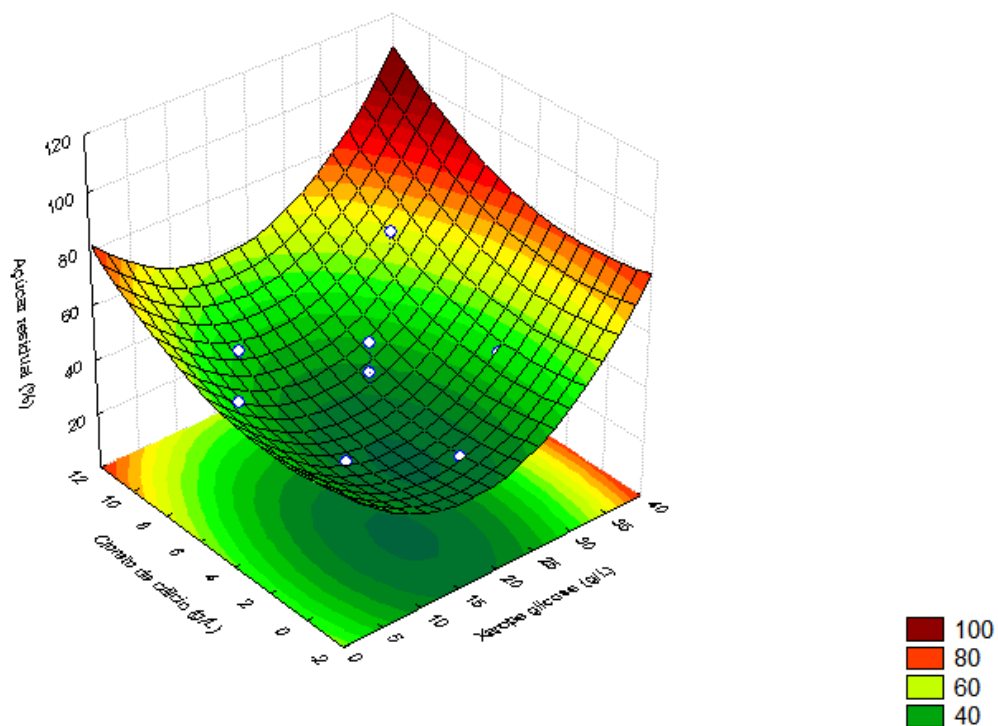


Figura 4.20: Superfície de resposta para açúcar residual em relação ao cloreto de cálcio e xarope de glicose.

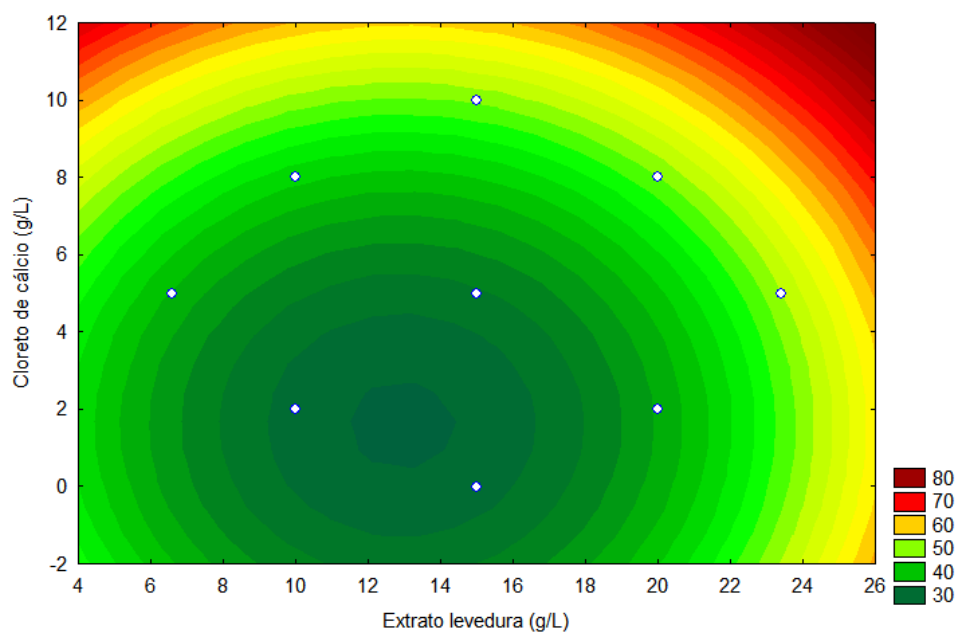


Figura 4.21: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e extrato de levedura objetivando a redução do açúcar residual.

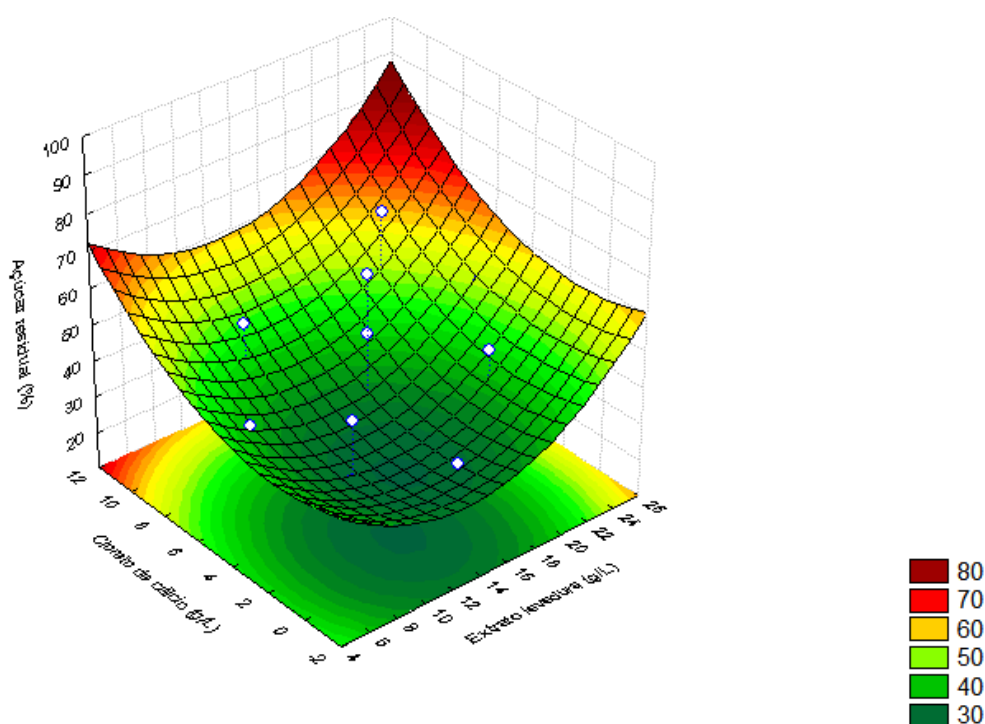


Figura 4.22: Superfície de resposta para açúcar residual em relação ao cloreto de cálcio e extrato de levedura.

Quando as variáveis estão nestas faixas de concentrações o açúcar residual que não foi consumido pelo microrganismo é de aproximadamente 30% da quantidade de

carboidratos inicial. Este valor considerado alto pode ser explicado porque o xarope de glicose apresenta polissacarídeos com estruturas complexas cujo microrganismo não consegue consumir. Outro fator considerável é a falta de oxigênio, haja vista que estes ensaios foram conduzidos em mesa agitadora. A cepa IT45 é um microrganismo extremamente aeróbio, seu crescimento é limitado na falta de oxigênio, com isso o consumo de carboidrato é reduzido.

Neste trabalho também foi quantificado o consumo de glicose e maltose, conforme as Figuras 4.23 e 4.24. A Glicose é considerada uma molécula de fácil absorção, foi evidente nas análises cromatográficas que o seu consumo é bem rápido, acontecendo para vários tratamentos em menos de 24 horas.

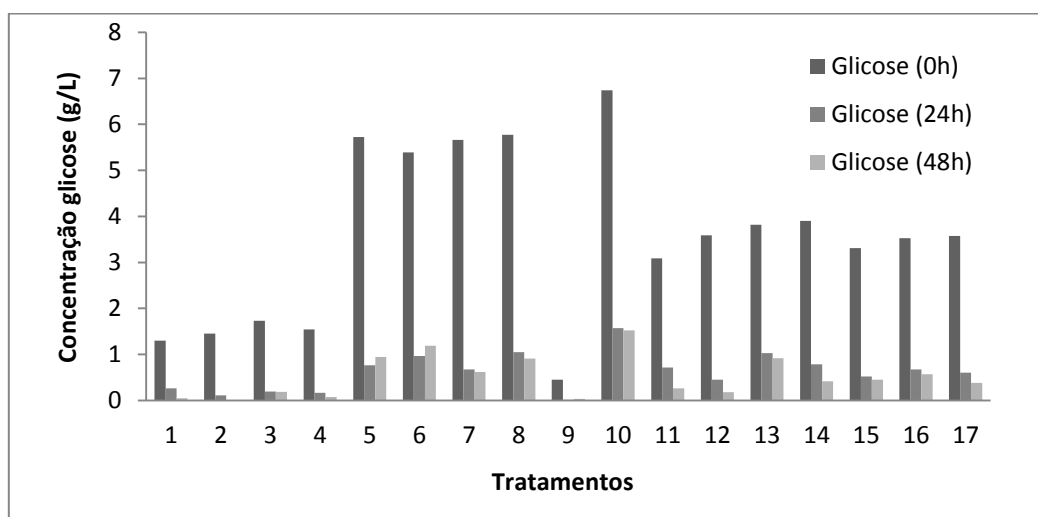


Figura 4.23: Consumo da glicose.

O mesmo não acontece para a maltose, em vários tratamentos como, por exemplo, o de número 5, 6, 8, 10 o consumo é bem baixo, não atingindo nem 50% se comparado com as condições iniciais. A maltose é formada por duas moléculas de glicose, por isso a absorção pelo microrganismo estudado torna-se mais difícil, uma vez que ele precisa quebrar essa molécula para absorvê-la. Este raciocínio também pode ser seguido para maltotriose (molécula formada por 3 glicoses) e polissacarídeos. A quantificação destes não foi realizada pela falta de padrão da maltotriose e não identificação dos polissacarídeos pelo fabricante do xarope de glicose.



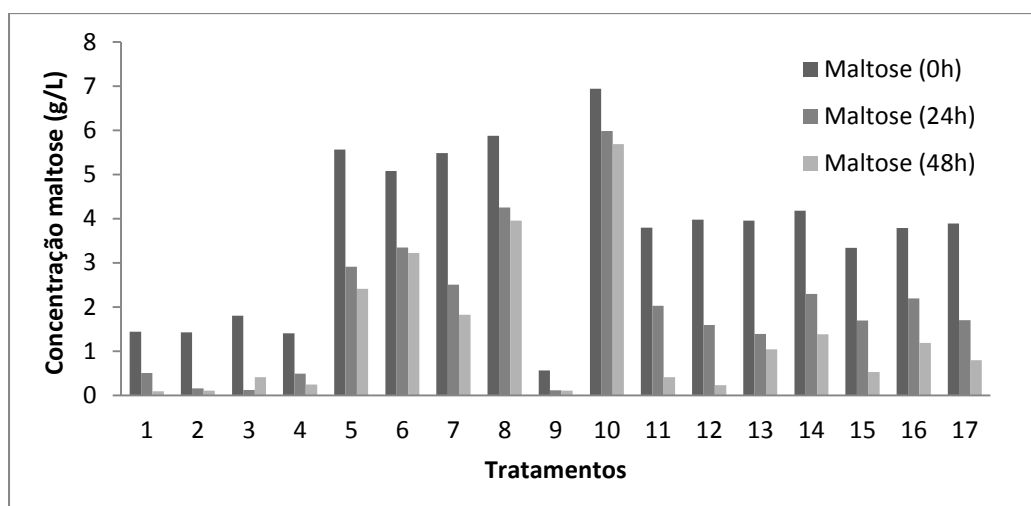


Figura 4.24: Consumo da maltose.

SOARES (2014) estudando produção de biossurfactante por cepas de *Bacillus sp*, observou-se que em meio de cultura suplementado com glicose, o consumo do substrato era muito rápido, dando-se nas primeiras 20 horas de ensaio. No seu trabalho não houve adição de outra fonte de carbono combinada com glicose. No entanto, acredita-se que o extrato de levedura teve papel importante na manutenção dos microrganismos para continuar excretando o biossurfactante até o final do ensaio que se deu em 72 horas.

ACCORSINI (2010) reporta que a glicose é uma fonte de carboidrato facilmente assimilável, responsável pelo rápido crescimento celular sendo consumida rapidamente. Ele retrata também que em ensaios de biossíntese, geralmente a glicose é combinada com outras fontes de carboidratos para obtenção de melhores resultados. Neste trabalho utilizou-se esta estratégia, haja vista que o meio de cultura possui diversas fontes de carboidratos.

#### 4.2.3 Avaliação da produção de Biossurfactantes Totais frente à suplementação do meio de cultivo

A resposta do surfactante de origem microbiana total (BST) foi analisada pelos dados da Tabela 4.2 e pelo diagrama de Pareto mostrado na Figura 4.25. Após análise estatística dos resultados experimentais é descrita a Equação Codificada 4.3, que apresenta 90% de significância.

$$\text{BST}(\text{g} \cdot \text{L}^{-1}) = 5,60 + 0,65X_1 - 0,88X_1^2 + 0,29X_2 - 1,70X_2^2 - 0,87X_3 - 0,71X_3^2 + 0,37X_1X_2 \quad (4.3)$$

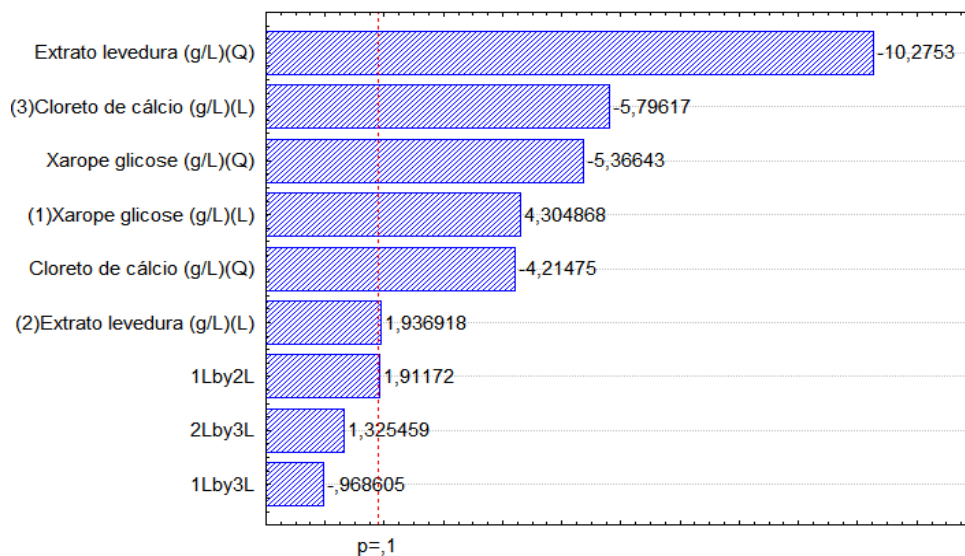


Figura 4.25: Diagrama de Pareto em relação às variáveis estudadas para açúcar residual.

O valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de aproximadamente 0,95, o que indica que cerca de 95% dos dados experimentais estão de acordo com o modelo. A Figura 4.26 mostra a distribuição dos resíduos em relação aos valores preditos pelo modelo. O comportamento dos resíduos girou em torno de zero e sem tendências o que indica variância constante para todos os valores da resposta.

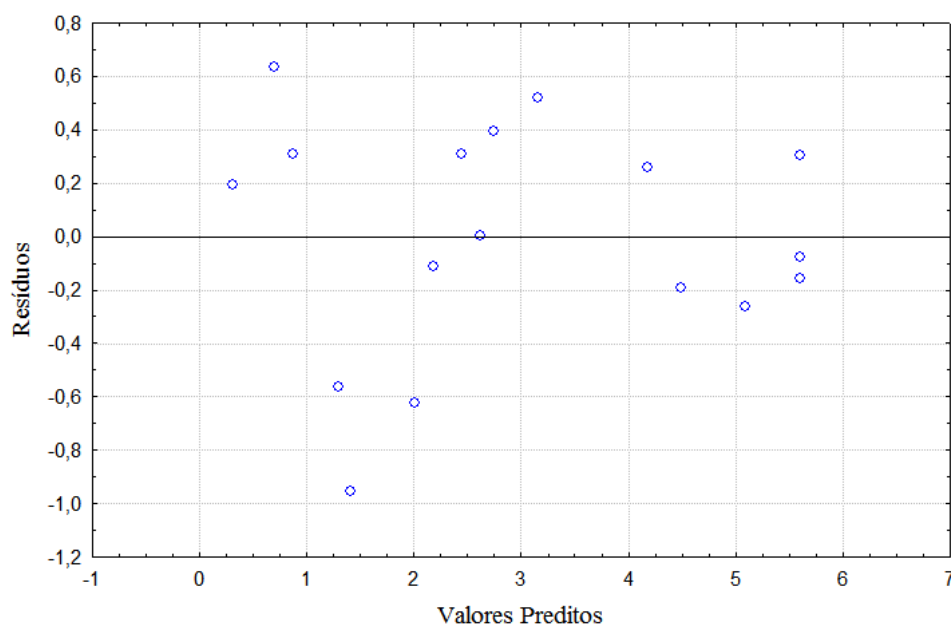


Figura 4. 26: Distribuição dos resíduos relativos aos biossurfactantes totais.

A Figura 4.27 mostra a distribuição dos valores preditos em função aos valores observados. Nela é possível notar a proximidade dos valores observados com os valores preditos, indicativo que o modelo é apropriado para análise dos dados.

Os valores positivos de X1 e X2 mostram que maiores concentrações de xarope de glicose e extrato de levedura aumentam a resposta de biossurfactante total, ou seja, sua concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) aumenta, podendo ser visto nos tratamentos 2 e 8, na Tabela 4.2, por exemplo. A variável de maior efeito na equação 4.3 é X3 (cloreto de cálcio), pois apresenta o maior coeficiente. Esta variável possui um efeito negativo, uma vez que o objetivo é aumentar a produção de biossurfactantes totais.

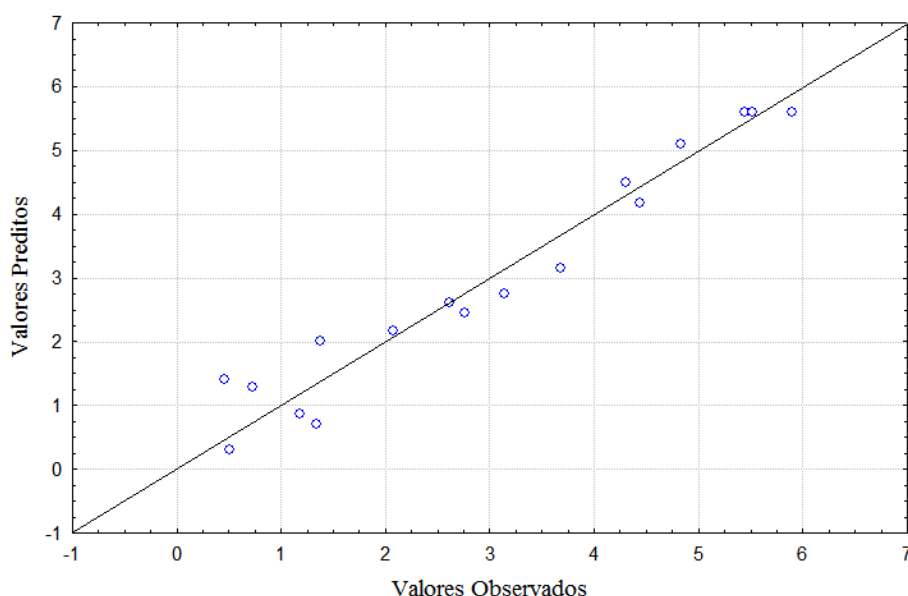


Figura 4.27: Valores preditos em função dos valores observados relativos aos biossurfactantes totais.

Utilizando os níveis vistos nas Figuras 4.28 a 4.33 os melhores resultados foram para a concentração de xarope de glicose na faixa de 15 a 33  $\text{g.L}^{-1}$ , extrato de levedura na faixa de 12 a 19  $\text{g.L}^{-1}$  e cloreto de cálcio na faixa de 0 a 6  $\text{g.L}^{-1}$ . Como se pode notar, a maior produção do surfactante de origem bacteriana está associada a altas concentrações de fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. O cloreto de cálcio para este fim pode ser desprezado, porém ele não deve ser descartado da formulação do meio de cultura devido sua excelente contribuição na esporulação do *Bacillus amyloliquefaciens* IT45.

Quando as variáveis estão nas faixas descritas anteriormente a produção de biossurfactante atinge concentrações média de 4,0  $\text{g.L}^{-1}$ , sendo a máxima concentração

de  $5,9 \text{ g.L}^{-1}$ . Esta metodologia de extração não é específica para um grupo de biossurfactantes, por isso o nome biossurfactantes totais, isto explica os altos valores de sua concentração. A quantificação é baseada no peso da amostra seca depois do processo de extração, com certeza há presença de outros surfactantes de origem microbiana como, por exemplo, iturina, bacilomicina, surfactina, entre outros.

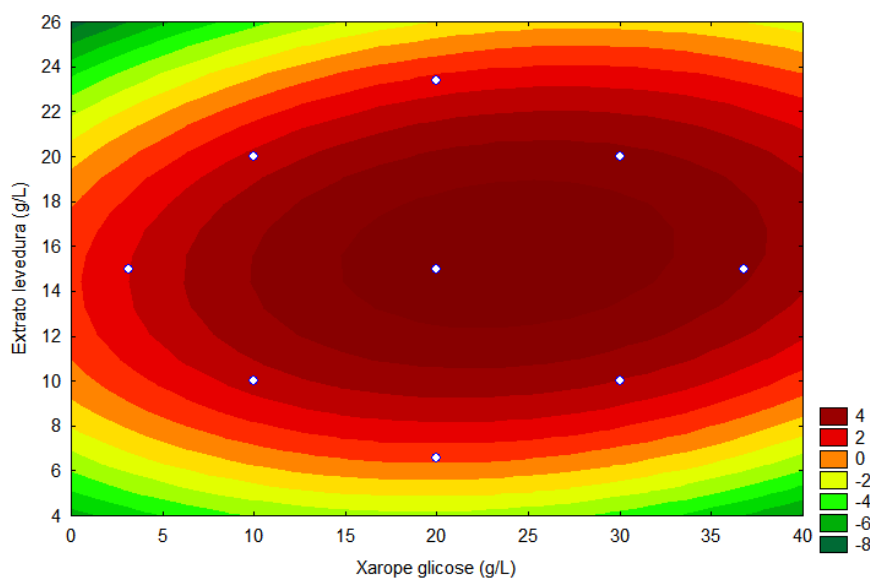


Figura 4.28: Curva de contorno para concentrações de extrato de levedura e xarope de glicose objetivando a máxima produção de biossurfactante.

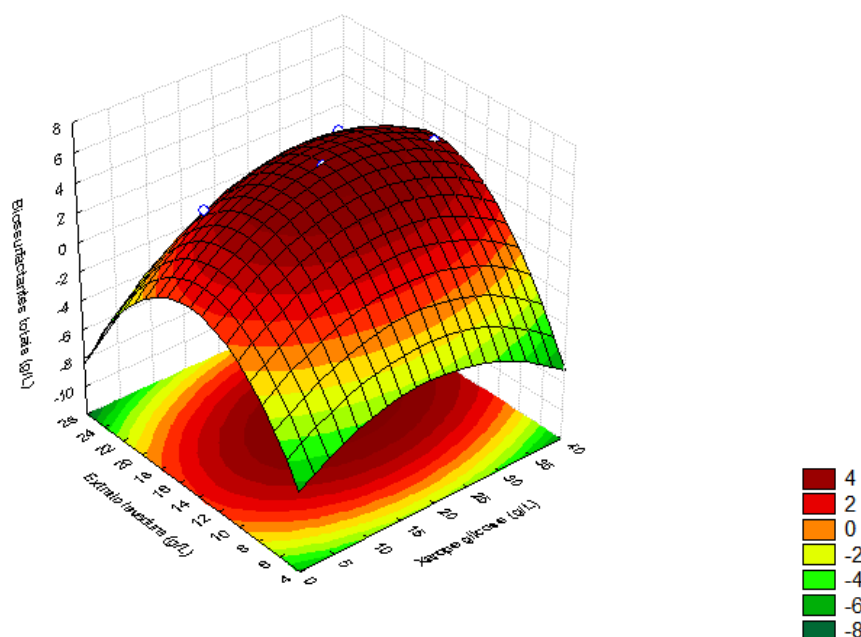


Figura 4.29: Superfície de resposta para biossurfactantes totais em relação ao extrato de levedura e xarope de glicose.

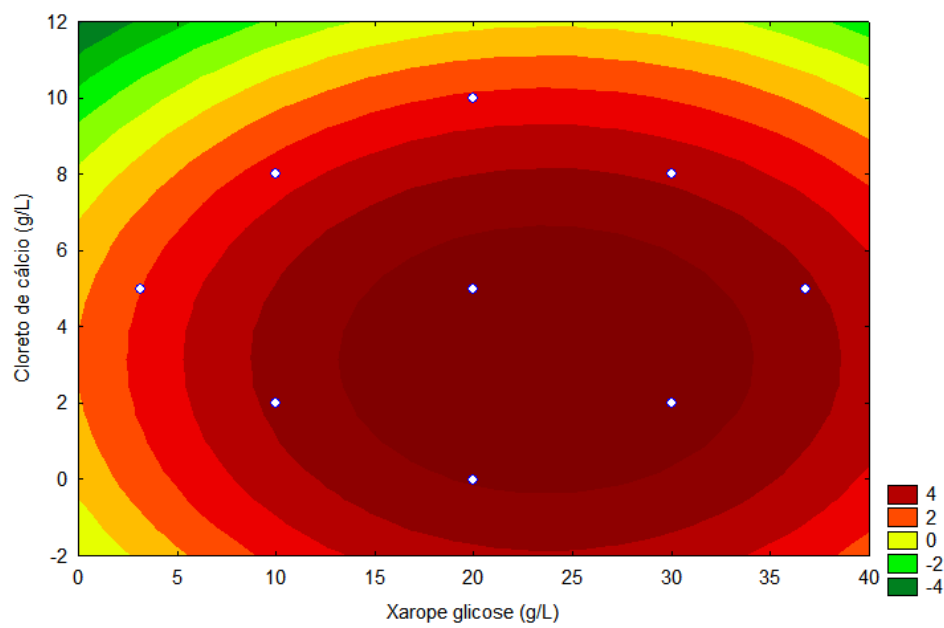


Figura 4.30: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e xarope de glicose objetivando a máxima produção de biossurfactante

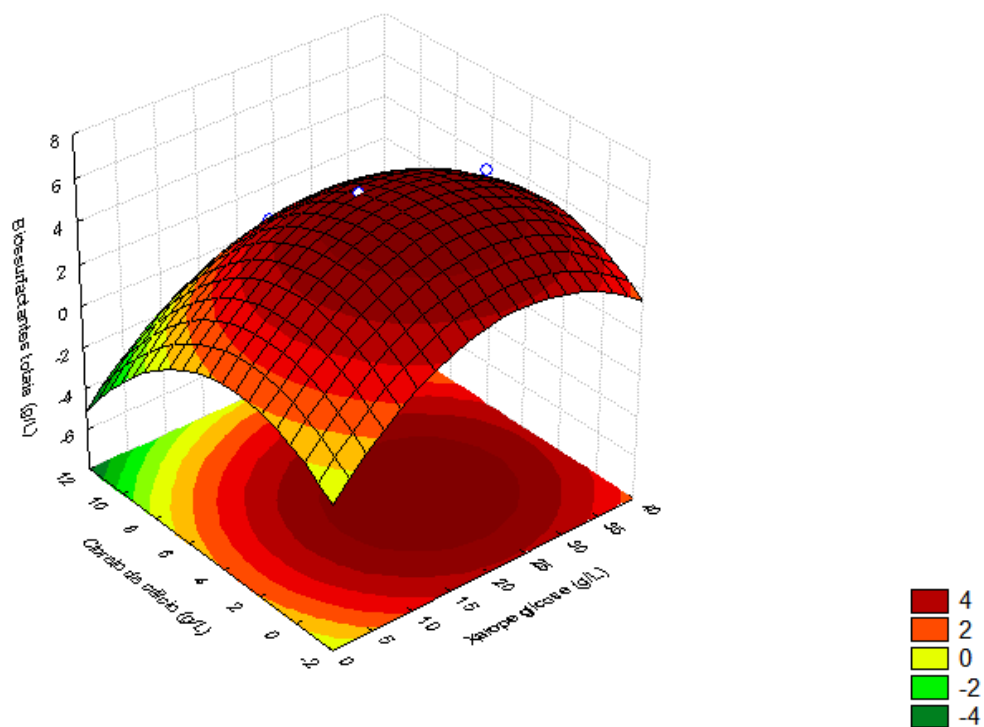


Figura 4.31: Superfície de resposta para biossurfactantes totais em relação ao cloreto de cálcio e xarope de glicose.

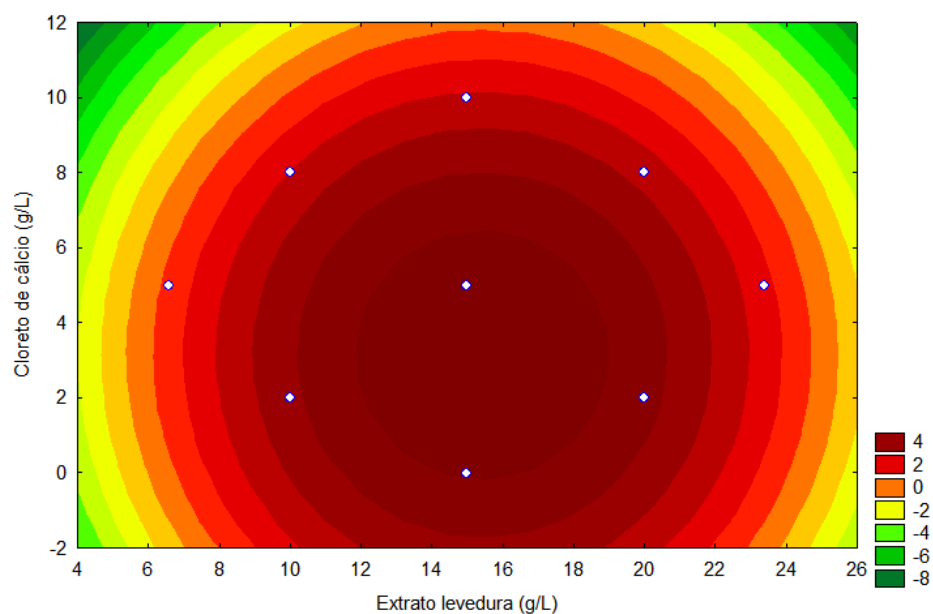


Figura 4.32: Curva de contorno para concentrações de cloreto de cálcio e extrato de levedura objetivando a máxima produção de biossurfactante.

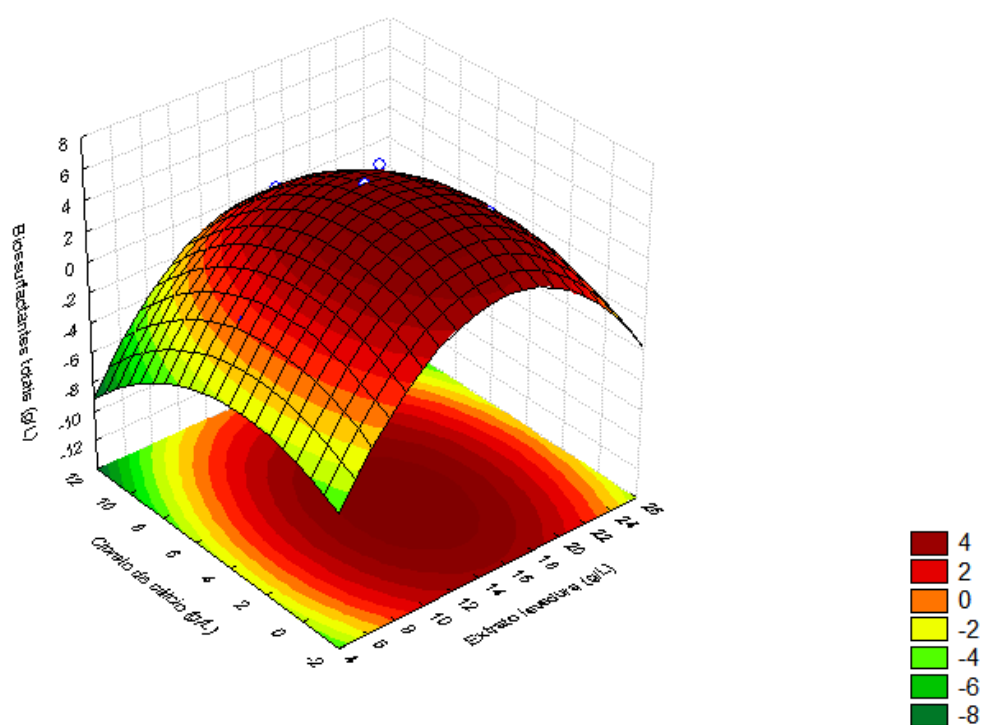


Figura 4.33: Superfície de resposta para biossurfactantes totais em relação ao cloreto de cálcio e extrato de levedura.

RADHIKA et al., (2014) estudando a produção de biossurfactantes por *Bacillus amyloliquefaciens* USTBb, validaram um modelo proposto no International Journal of

Current Microbiology and Applied Science. Esses pesquisadores utilizando um método de extração baseado em precipitação ácida e liofilização deste precipitado, conseguiram aumentar mais de 3 vezes (2,2 para 6,85 g.L<sup>-1</sup>) a produção do biossurfactante quando comparado com outras condições de processo.

Portanto, para este trabalho, conclui-se que a melhor receita de meio de cultura, visando a máxima produção de biossurfactantes totais, maior redução da tensão superficial e também menor percentual de açúcar residual é para o xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio nas concentrações (g.L<sup>-1</sup>) de 20, 15 e 4, respectivamente. Estes valores foram obtidos da interseção entre as faixas de melhores resultados apresentados nas seções 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3. O meio de cultivo (FR08) original apresentava concentrações (g.L<sup>-1</sup>) de xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio de 30, 20 e 8, respectivamente.

#### 4.2.4 Acompanhamento do crescimento celular e pH

O crescimento celular foi acompanhado mediante amostragem nos tempos 0, 12, 24, 48 horas. No Anexo encontra-se a curva de calibração referente à quantificação de número de células viáveis ( $N_v$ ) e as Equações 4.4 fornecem o valor concentração em (CFU.mL<sup>-1</sup>), apresentando coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0.990.

$$N_v \text{ (CFU.mL}^{-1}\text{)} = 1,0.10^8 . Abs_{650nm} - 3,0.10^7 \quad (4.4)$$

Todos os tratamentos partiram de uma concentração celular de  $3,00 \times 10^5$  CFU.mL<sup>-1</sup> e chegaram em valores reportados na Figura 4.16, depois de 48 horas de fermentação. O crescimento celular com maior destaque foi para o tratamento número 10, chegando a concentração de  $1,4 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>. Tal concentração pode ser explicada porque este tratamento apresenta maior concentração de fonte de carbono.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 6,80 inicialmente. Conforme a Figura 4.16, o pH final ficou próximo a neutralidade variando de 6,2 à 7,5. O menor e o maior valor de pH foi 6,2 e 7,54 para os tratamentos 11 e 9, respectivamente.

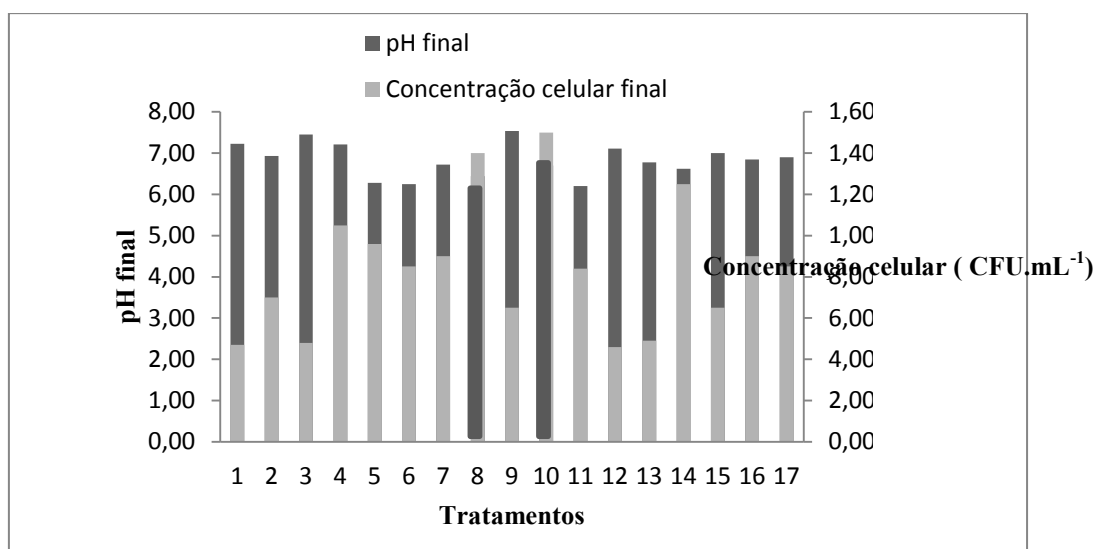


Figura 4.34: Concentração celular e pH para amostragem 48 horas.

YAN et al. (2017) estudando a produção de Surfactina por duas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* a partir de resíduos de grão de destilação (DGS) como substrato, tiveram bons rendimentos da biomassa. Avaliando o efeito da razão de inoculação das cepas MT45 e X82 eles observaram que a concentração celular final aumentou com aumento da quantidade de X82 no inoculo, variando de  $5,1 \times 10^8$  para  $12,6 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. A máxima concentração foi obtida para a proporção de MT45 e X82 sendo 1:5. O pH teve comportamento descendente até o final da fase exponencial e ascendente na fase estacionária, para a maioria dos tratamentos.

FERNANDES (2006) observou crescimento celular em até 40 horas de processo, onde se obteve 7,8 g.L<sup>-1</sup> de biomassa e a maior concentração de biosurfactante 2 g.L<sup>-1</sup>. Esta relação direta entre biosurfactante e crescimento celular também foi observada nos trabalhos de CARVALHO (2005) e OLIVEIRA (2006). Tais autores desconfiam que o maior rendimento na produção destes compostos esteja associado à restrição de oxigênio.

#### 4.3 Análise de condições operacionais em biorreator piloto, visando à produção de Surfactina

Nesta etapa foram realizadas 6 fermentações em um biorreator semi automático (Mobile Pilot Plant Fermentor, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) com



capacidade total de 40 litros. Na seção 3.4.3 está o detalhamento do procedimento experimental.

A purificação do biossurfactante Surfactina foi por meio de uma precipitação ácida com HCl em uma concentração de 3M até o pH 2, seguida de uma extração líquido-líquido utilizando cloreto de metileno. Todos os procedimentos experimentais de purificação, caracterização e quantificação estão descrito na seção 3.6. Para caracterização do bioproduto, um padrão de surfactina extraído de *Bacillus subtilis* com 98% de pureza foi comprado da empresa Sigma Aldrich. O padrão forneceu vários picos em diferentes tempos de retenção e o tempo de 13,5 minutos, presente em todas as fermentações, foi definido pelos autores como resposta a produção de surfactina. A curva de calibração para quantificar a surfactina neste tempo de retenção se encontra no Anexo e também o espectrograma completo com todos os picos.

Foi estudada a influência da fonte de carbono (xarope de glicose – Glucodry), fonte de nitrogênio (extrato de levedura – Biorigin) e cloreto de cálcio na produção de biomassa celular e biossurfactante surfactina. O consumo de glicose e maltose juntamente com o percentual de açúcar residual presente no meio de cultivo também foram calculados, afinal deseja-se um meio de cultura que maximize a produção de células e surfactina e que apresente menor resíduo possível. A concentração do meio de cultura e inóculo para cada bateladada está na Tabela 3.5 da seção 3.4.3.

Para cada tratamento foram amostrados 4 pontos sendo eles nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas, com exceção da Fermentação 1. As Figuras 4.35, 4.36 e 4.37 mostram a cinética de crescimento celular, cinética de produção da surfactina e também o açúcar residual para todas as fermentações.

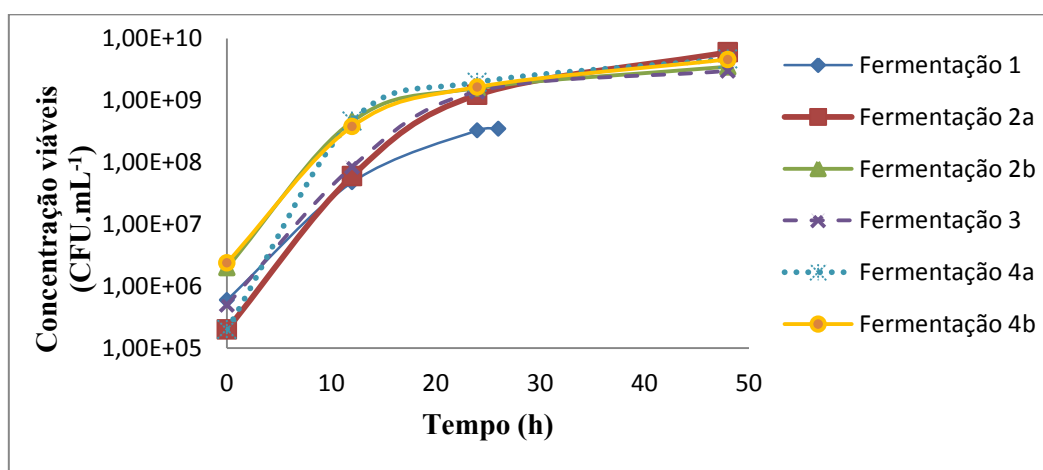


Figura 4.35: Cinética de crescimento celular para fermentações em biorreator.

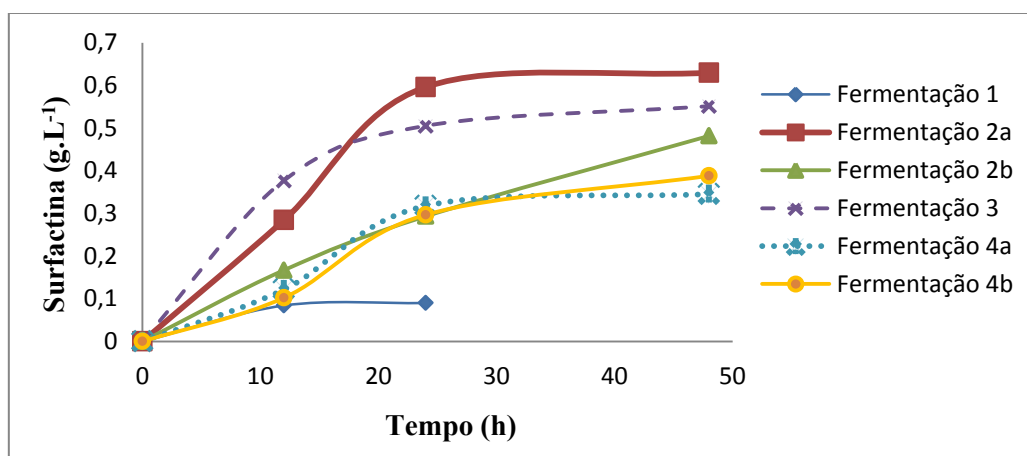


Figura 4.36: Cinética de produção da Surfactina.

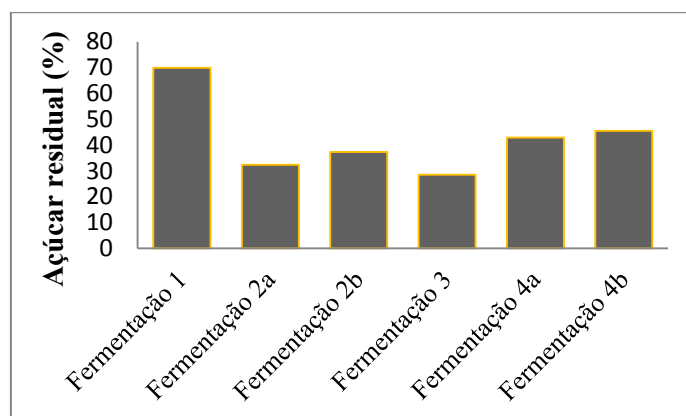


Figura 4.37: Açúcar residual em 48 horas de processo fermentativo.

Pode-se observar que a Fermentação 1 teve o menor desempenho, uma vez que apresentou o menor crescimento celular de  $3,8 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>, maior açúcar residual em torno de 69% e a menor produção biossurfactantes de 0,1 g.L<sup>-1</sup>. Um dos fatores decisivos para este mau desempenho foi a limitação da quantidade de xarope de glicose para 3,5 g.L<sup>-1</sup>.

O microrganismo consome rapidamente a glicose e maltose nas primeiras 20 horas de processo, conforme visto nas Figuras 4.38 e 4.39. Neste período, analisou o caldo fermentado em microscópio e identificou a presença de muitos esporo e células vegetativas. Depois de 26 horas o caldo fermentado estava aproximadamente 100% esporulado e a fermentação foi finalizada.

Acredita-se que baixa produção do bioproduto pode estar associada a este baixo crescimento celular devido à baixa concentração do xarope de glicose. Esta relação

direta entre biossurfactante e crescimento celular também foi observada nos trabalhos de CARVALHO (2005) e OLIVEIRA (2006). Tais autores desconfiaram que o maior rendimento na produção destes compostos esta associado à restrição de oxigênio. O alto valor do açúcar residual pode ser explicado pela falta de produção de enzimas responsáveis pela quebra dos polissacarídeos, ou seja, o microrganismo para este tratamento consumiu somente parte da glicose, maltose e maltotriose presente no xarope de glicose.

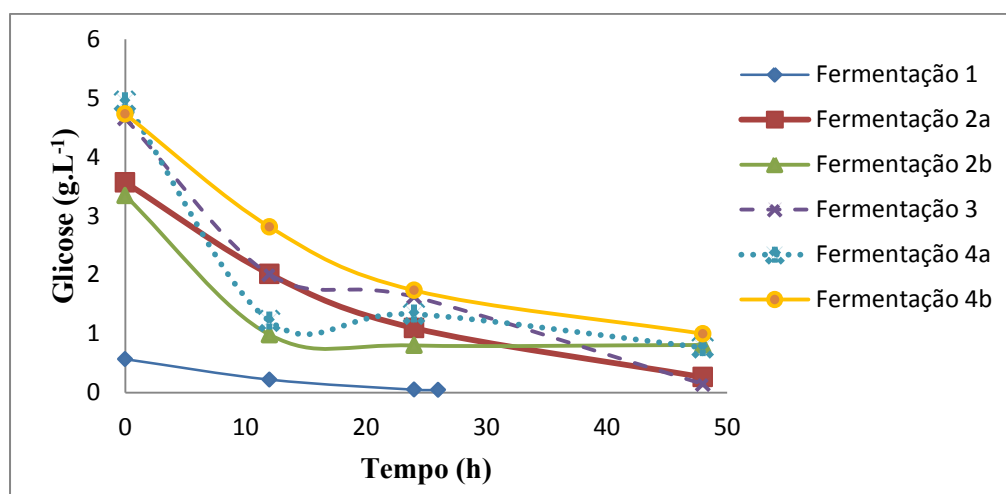


Figura 4.38: Cinética de consumo da Glicose.

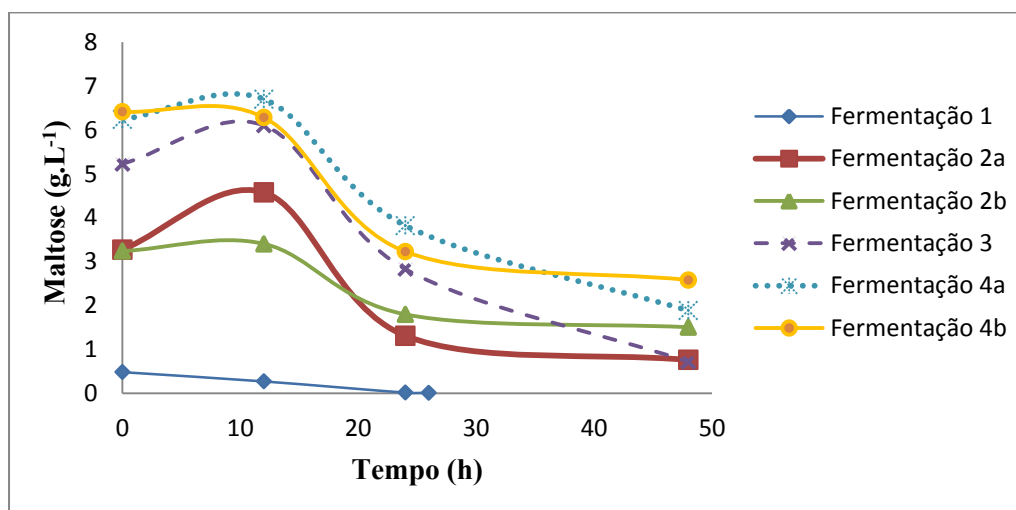


Figura 4.39: Cinética de consumo da Maltose.

O restante das fermentações tiveram resultados satisfatórios, na qual se destaca a Fermentação 2a como sendo a que apresentou melhores resultados. Este tratamento foi a receita proposta pelo Planejamento Composto Central do item anterior, apresentou

crescimento de biomassa celular final de  $6,0 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, açúcar residual de aproximadamente 28% e produção de surfactina de 0,63 g.L<sup>-1</sup>.

Quando repetiu as condições da Fermentação 2a, porém com concentração de inóculo quase 10 vezes maior, o resultado não foi o mesmo, sendo crescimento celular de  $3,5 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, açúcar residual de 37% e produção de surfactina de 0,48 g.L<sup>-1</sup>. Verificou-se que quando a fermentação no biorreator começou com a ordem de grandeza  $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup> o processo fermentativo liberou muita espuma no começo, então para controle utilizou-se muito antiespumante nas primeiras 12 horas. Portanto, acredita-se que teve certa inibição no crescimento celular resultando em uma diminuição da biomassa final, consequentemente maior açúcar residual.

YEH; WEI; CHANG (2006) estudaram a produção de surfactina em um biorreator mecanicamente agitado, para tentar resolver o problema da espuma os autores propuseram um recipiente coletor de espuma e um recirculador de células, nesse caso a espuma formada foi utilizada para a separação de surfactina. Com esse sistema conseguiram manter mais de 90 % do meio de cultura no biorreator no final do processo, obtendo assim, bons rendimentos e um elevado consumo da fonte de carbono. Esse estudo apresenta grande importância, pois para o controle de espuma em cultivos aerados normalmente utiliza-se antiespumantes, que além do elevado custo, ainda podem ser prejudiciais para o crescimento celular KIERAN; MACLOUGHLIN; MALNE (1997).

Dando continuidade ao raciocínio de aumentar a fonte de carboidrato, tem-se a Fermentação 3, na qual foi utilizado 25 g.L<sup>-1</sup> de xarope de glicose e manteve as mesmas concentrações para extrato de levedura 15 g.L<sup>-1</sup> e cloreto de cálcio 2 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados revelam valores de crescimento da biomassa celular satisfatório de  $3,2 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>, açúcar residual de 27,5% e produção de surfactina de 0,55 g.L<sup>-1</sup>.

As Fermentações 4a e 4b apresentam as mesmas condições de concentração da fonte de carbono e nitrogênio, porém aumentados se comparados com os tratamentos anteriores. Os resultados ficaram próximos sendo  $4,7 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> e  $4,6 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> e nestes tratamentos também foram avaliados a viabilidade dos esporos.

Quando realiza o procedimento descrito no item 3.5.2 são quantificados esporos e células vegetativas viáveis, porém é interessante também saber somente a quantidade de esporos vivos, pois são eles e componentes da formulação, responsáveis pela vida de prateleira. Para isto foi realizado um tratamento térmico também explicado no item 3.5.2 e os resultados da concentração de esporos vivos foram  $4,5 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> para

Fermentação 4a e  $4,3 \times 10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup> para Fermentação 4b. Como aumentou a concentração de xarope de glicose e extrato de levedura o açúcar residual percentual foi o maior de todos os tratamentos, sendo 43% para Fermentação 4a e 45,5% para Fermentação 4b. A produção de biossurfactantes foi intermediária, sendo 0,345 e 0,39 g.L<sup>-1</sup> para Fermentação 4a e 4b, respectivamente.

Fazendo uma análise referente ao tempo de fermentação nas Figuras 4.35 e 4.36, é possível notar que depois de decorridas 30 horas de processo tanto a produção de surfactina quanto a produção de biomassa celular fica praticamente constante para maioria dos tratamentos. O processo não pode ser finalizado, pois no caldo fermentado possui muitas células vegetativas e “esporos ligados” que reduzem o tempo de vida de prateleira do caldo fermentado.

Conforme a Figura 4.40, foi monitorado o pH para todos os tratamentos. De acordo com estes pontos amostrados, observa-se um comportamento crescente, estabilizando no final do processo em valores próximos a 8. O valor de pH igual a 8 é um indicativo de finalizar o processo, pois este foi verificado no final de todas bateladas, até mesmo na Fermentação 1 que foi um processo rápido devido a fonte de carboidrato ter concentração baixa. YEH; WEI; CHANG (2006) também observaram que com o crescimento celular e produção de surfactina, o pH tendeu a diminuir acentuadamente no início do cultivo, em compensação no final do cultivo, o pH aumentou gradualmente, essa queda pode ser devido a formação de metabolitos ácidos durante a fermentação.

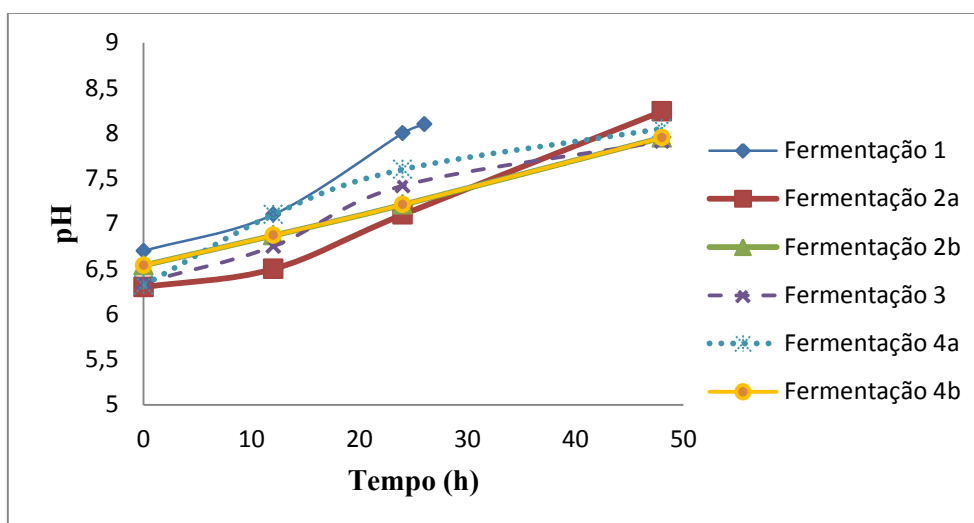


Figura 4.40: Acompanhamento do pH das fermentações.

#### 4.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR) para *Bacillus amyloliquefaciens* IT45

A caracterização dos biossurfactantes excretados pelo *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 foi realizada mediante Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR). As configurações para a análise estão descrito na seção 3.6.3. A Figura 4.41 mostra os espectrogramas para o padrão surfactina extraída de *Bacillus subtilis* comprado da empresa Sigma Aldrich, representado pela letra A, o caldo bruto fermentado livre de células representado pela letra B e a letra C representando a surfactina extraída utilizando o método descrito na seção 3.6.

Os resultados estão apresentados na faixa de frequência de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , pois para valores menores ocorreu interferência. Analisando-se os espectros vibracionais do padrão surfactina (A) e a surfactina purificada neste trabalho (C), verificaram-se bandas características de peptídeos, indicando as seguintes ligações: frequência de aproximadamente 1655  $\text{cm}^{-1}$  indicando o estiramento CO, faixa de frequência de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  indicando canais alifáticos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , região de estiramento axial entre 3200 e 3400  $\text{cm}^{-1}$  devido às ligações N-H. Houve diferença significativa entre os espectrogramas, tal fato pode ser explicado pelo padrão ser extraído de *Bacillus subtilis* enquanto que a surfactina produzida neste trabalho foi de *Bacillus amyloliquefaciens*.

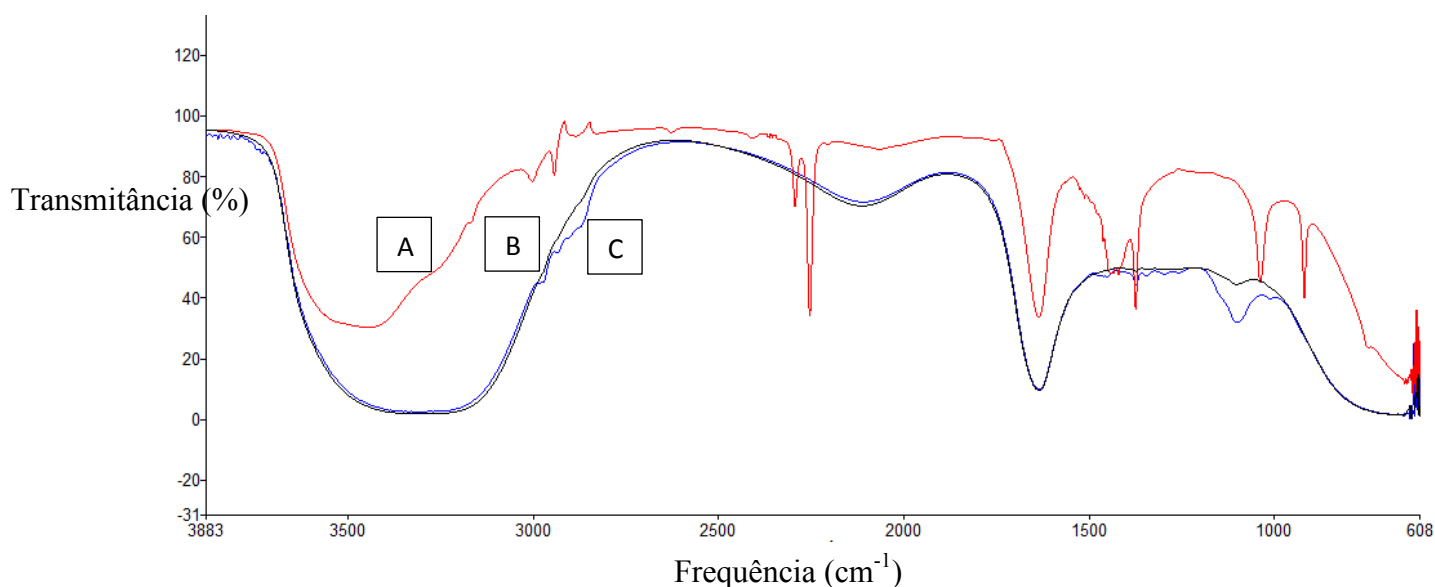


Figura 4.41: FTIR – Espectrogramas vibracionais na região do infravermelho para A (Surfactina padrão Sigma Aldrich), B (caldo fermentado livre de células) e C (Surfactina purificada).

#### 4.5 Ação antimicrobiana frente fungos patogênicos de diferentes gêneros

A Tabela 4.3 mostra o espectro de atividade antimicrobiana dos lipopeptídeos presente no caldo fermentado produzidos pelo *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 frente 5 fungos patogênicos de diferentes gêneros, dentre eles *Sclerotinia* GF521, *Fusarium* GF531, *Colletotrichum* GF520, *Botrytis* GF519 e *Macrophomina* GF522. Os testes foram realizados com o sobrenadante, ou seja, caldo fermentado livre de células e também com lipopeptídeo Surfactina extraído.

A Figura 4.42 ilustra a inibição depois de um período de 96 horas de incubação a 25 °C. Foram realizadas duplicatas para cada tratamento e as regiões identificadas pelas letras “A”, “B” e “C” são o controle, aplicação da Surfactina e aplicação do sobrenadante, respectivamente.

Os biocompostos presentes no caldo fermentado livre de células mostraram ser mais eficientes quando comparados à ação da Surfactina extraída, uma vez que esta não conseguiu inibição para nenhum patógeno. Este fato pode ser explicado pela baixa quantidade de produção deste lipopeptídeo, enquanto que no caldo fermentado pode ter outros biossurfactantes como iturina, fengycina, bacilomicina. Outro fator a se considerar é o efeito sinérgico entre a surfactina e a iturina A que aumenta a absorção e estabilidade deste antifúngico na membrana citoplasmática do microrganismo alvo RAZAFINDRALAMBO et al. (1993). O sinergismo desta mistura permite incrementar a atividade hemolítica e antifúngica em até 40% THIMON et al. (1992), RAZAFINDRALAMBO et al. (1993).

Tabela 4.3: Atividade antimicrobiana dos metabólitos excretados pelo *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 fungos de diferentes gêneros.

<b>Fungos</b>	<b>Halo C* (mm)</b> <b>X ± δ</b>	<b>Halo B** (mm)</b> <b>X ± δ</b>
<b>1) <i>Sclerotinia</i> – GF 521</b>	11,50 ± 0,70	0,00 ± 0,00
<b>2) <i>Fusarium</i> – GF 531</b>	10,75 ± 1,06	0,00 ± 0,00
<b>3) <i>Colletotrichum</i> – GF 520</b>	11,75 ± 0,35	0,00 ± 0,00
<b>4) <i>Botrytis</i> – GF 519</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>5) <i>Macrophomina</i> – GF 522</b>	9,75 ± 0,35	0,00 ± 0,00

Halo C\*: Halo (mm) de inibição frente ao sobrenadante.

Halo B\*\*: Halo (mm) de inibição frente à Surfactina.

O fungo que apresentou maior inibição foi o *Colletotrichum* GF520 cuja média do halo de inibição em torno do disco saturado com o sobrenadante do caldo fermentado, foi de 11,75 mm. Outro destaque foi para o *Botrytis* GF519, que não apresentou inibição pelo sobrenadante nem pela Surfactina.

A literatura apresenta vários estudos da ação antifúngica do *Bacillus amyloliquefaciens*. YOSHIDA et al., (2001) trabalhando com cepa RC-2 deste microrganismo constatou a ação antifúngica contra o *Colletotrichum dematium* responsável pela doença chamada antracnose. Além deste fungo, o filtrado da cultura também inibiu crescimento de outras bactérias e fungos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* e *Rosellinia necatrix*. Foram isolados do cultivo sete tipos de compostos antimicrobianos e o lipopeptídeo iturina A2 foi identificado.

Fungos e oomicetos patógenos de plantas foram controlados devido à elevada atividade inibitória da cepa GA1 de *B. amyloliquefaciens*. Mostrou enorme potencial de diminuição das doenças nas plântulas pela ação de antibiose direta contra patógenos oriundos do solo, quando foram utilizadas no tratamento de sementes. Este microrganismo também reduziu a infecção pós-colheita de maçãs por *Botrytis cinerea*, agente causador da doença do mofo cinzento. Os dados sugerem que a cepa GA1 apresenta enorme potencial como agente de biocontrole TOURE et al. (2004); ARGUELLES-ARIAS et al. (2009).

FERNANDES (2006) estudando a atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas constatou que os lipopeptídeos biossurfactantes produzidos pelo *B. subtilis* R14 mostraram ser mais ativos para bactérias gram-positivas. Destaque para a bactéria *Enterococcus faecalis*, cuja média dos halos de inibição foi de 14,6 mm.

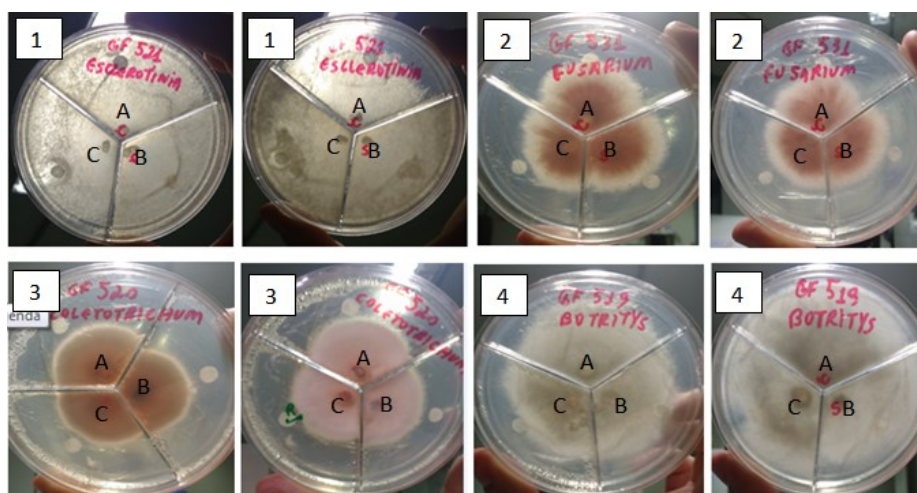


Figura 4. 42: Atividade antifúngica contra 4 fungos de diferentes gêneros.



## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 Conclusões

Os resultados obtidos permitiram a obtenção das seguintes conclusões:

- Os testes preliminares foram fundamentais para determinar as condições do Planejamento Composto Central. Nesta etapa definiram as faixas de concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) para as três variáveis estudadas como sendo: 5 – 30 para xarope de glicose; 10 – 20 para extrato de levedura, 2 – 8 para cloreto de cálcio. Também foi estabelecido o garrafão de 5 litros com 500 mL de meio de cultivo como sendo o melhor ambiente e a se fermentar.
- Com Planejamento Composto Central foi possível desenvolver equações para tensão superficial, açúcar residual e biossurfactantes totais quando se variam concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) do xarope de glicose na faixa de 3,18 – 36,82; extrato de levedura na faixa de 6,6 – 23,40 e cloreto de cálcio na faixa de 0 – 10.
- A tensão superficial foi reduzida de valores acima de 50 para 30 mN/m quando os reagentes estavam nas faixas de concentração ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de: xarope de glicose 20 – 27; extrato de levedura 15,0 – 18,5; cloreto de cálcio 2 – 4.
- O menor percentual de açúcar residual foi de 31%. Valor encontrado quando as concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) das variáveis estiverem nas faixas de: xarope de glicose 14 – 20; extrato de levedura 12 – 15 e cloreto de cálcio de 1 – 3.
- Foi observado que o consumo de glicose ocorreu primeiro que a maltose para a maioria dos tratamentos do planejamento, chegando a valores próximo de zero antes das primeiras 24 horas.
- A máxima produção de biossurfactantes totais foi em média de  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$  em faixas de concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de xarope de glicose de 15 – 33 e extrato de

levedura de 12 – 19. A concentração de cloreto de cálcio para esta resposta pode ser desconsiderada.

- A melhor meio de cultura visando a máxima produção de biossurfactantes totais, menor redução da tensão superficial e também menor açúcar residual é para xarope de glicose, extrato de levedura e cloreto de cálcio nas concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) de 20, 15 e 4, respectivamente.
- O crescimento biomassa celular não foi otimizado pelo Planejamento Composto Central, porém foi acompanhado para todos os tratamentos assim como o pH. É possível afirmar que este crescimento celular foi maior para maiores concentrações de xarope de glicose. O pH final dos tratamentos do planejamento variaram de valores de 6,2 a 7,5.
- A baixa produção do bioproduto pode estar associada ao baixo crescimento celular, em condições limitadas de xarope de glicose como foi visto na Fermentação 1, feita em biorreator.
- O melhor resultado das fermentações feitas em biorreator foi a receita proposta pelo Planejamento Composto Central, apresentou crescimento de biomassa celular final de  $6,0 \times 10^9 \text{ CFU.mL}^{-1}$ , açúcar residual de aproximadamente 28% e produção de Surfactina de  $0,63 \text{ g.L}^{-1}$ .
- Verificou-se que quando a fermentação no biorreator começou na ordem de grandeza  $10^6 \text{ CFU.mL}^{-1}$  o processo fermentativo liberou muita espuma nas primeiras 12 horas.
- O caldo fermentado livre de células mostrou-se eficiente, causando inibição em 4 fungos patógenos dos 5 testados.

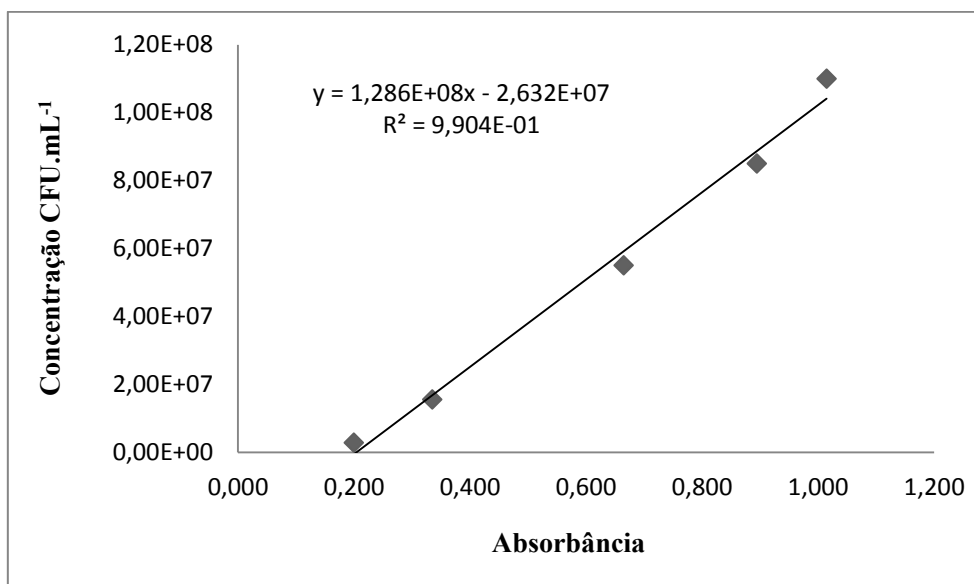
## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Algumas sugestões para futuros trabalhos são apresentadas a seguir.

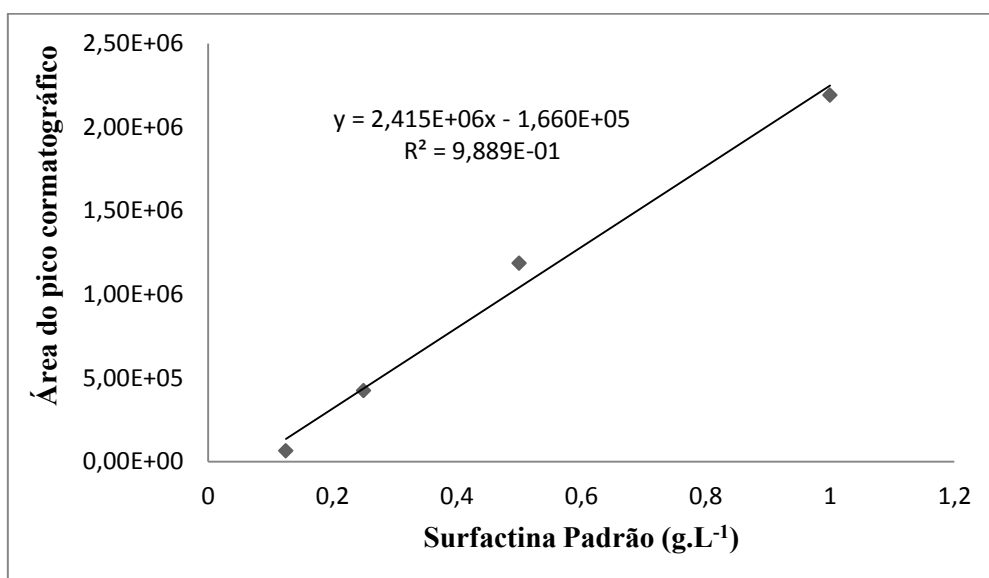
- Estudar diferentes metodologias para recuperação de biossurfactantes;
- Fazer estudo prévio do inóculo, se possível aperfeiçoar a concentração dos reagentes do meio de cultura visando a maior produção de células vegetativas. Afinal, inóculo concentrado favorece o processo fermentativo posterior;
- Verificar a produção de ácidos orgânicos, pois o *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 é registrado como solubilizador de fósforo. Portanto, é bem provável ele excrete alguns ácidos orgânicos responsáveis por essa solubilização;
- Fazer caracterização de outros metabólitos secundários como a iturina e fengycina. São biossurfactantes muito explorados na literatura, que apresenta ação antimicrobiana;
- Avaliar a influência do antiespumante no crescimento celular e produção dos metabólitos secundários;
- Realizar o cultivo do *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 e avaliar a produção do biossurfactante e crescimento de biomassa celular em sistema descontínuo alimentado com vazão controlada e também em sistema de cultivo contínuo;
- Estudar meio de cultura alternativos, compostos de resíduos da indústria como o melaço de soja, melaço de cana-de-açúcar, por exemplo. São resíduos com alto teor de carboidratos e que possuem baixo valor econômico;
- Verificar a presença de enzimas que ajudam na quebra do substrato, como a  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase. Isso facilitará o entendimento de qual fonte de carboidrato é ideal para o *Bacillus amyloliquefaciens* IT45;

## ANEXO

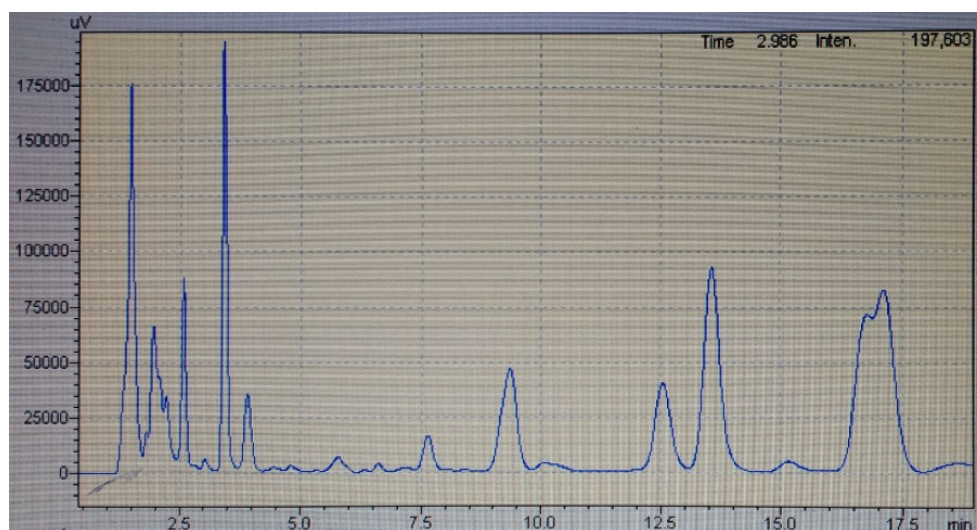
Curva de calibração para quantificação do número de células viáveis. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 650nm.



Curva de calibração para quantificação da Surfactina no tempo de retenção de 13,5 minutos.



Cromatograma referente ao padrão Surfactina extraído de *Bacillus subtilis*, da empresa Sigma Aldrich.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acorssini, F.R. Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação do seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono. 89f. (Dissertação em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

ARGUELLES-ARIAS, A. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, v. 8, n. 63, 2009.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>

Azevedo, J.L. Controle Biológico. Editora Embrapa: Jaguariúna SP, 1998. v. 1. p. 1730.

Banat, I.M.; Samarah, N.; Murad, M.; Horne, R.; Banerjee, S. Biosurfactante production and use in oil tank clean-up. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 7, 80-88, 1991.  
<https://doi.org/10.1007/BF02310921>

Banat, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, *Bioresource Technology*, v. 51, p. 1-12, 1995.  
[https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00101-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00101-6)

Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 53, p. 495-508, 2000.  
<https://doi.org/10.1007/s002530051648>

Bertrand, J.C.; Bonin, P.; Goutx, M.; Gauthier, M.; Mille, G. The potential application of biosurfactants in combating hydrocarbon in marine environments. *Research in Microbiology*, v.145, n.1, p. 53-56, 1994.  
[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90070-1)

Bland, J.M. The first synthesis of a member of the iturin family, the antifungal cyclic lipopeptide, iturin-A2. *Journal of Organic Chemistry*. v. 61, p. 5663-5664, 1996.  
<https://doi.org/10.1021/jo960452n>

Bognolo, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A*:

Physicochemical and Engineering Aspects, v.152, n.1, p. 41-52, 1999.  
[https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00684-0)

Bodour, A.A.; Guerrero-Barajas, C.; Jiorle, B.V.; Malcomson, M.E; PAULL. A.K., SOMOGYI, A; TRINH, L.N.; BATES, R.B.; MAIER, R.M Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. staim MTN11. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, p. 114-120, 2004.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.114-120.2004>

Bonmatin, J. M., Lapr v te, O.; Peypoux, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*. v. 6, p. 541-556, 2003.  
<https://doi.org/10.2174/138620703106298716>

Borges, C. N. B. F. Estudo do fator de envelhecimento na classificação geográfica automática de ramas petrolíferas. Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, 115 p., 2007.

Bugay, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp. Dissertação Mestrado, Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, 2012.

Cameotra, S.S.; Makkar, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 7, 262-266, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006>

Carvalho, A.L.U. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: produção de lipopeptídeos e esporos. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50p, 2005.

CHANDANKERE, R., JUN, Y., CHOI, M.M.F., MASAKORALA, K., CHAN, Y. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochem. Eng. J.* 74: 46 53, 2013.

Chanway, C. P.; Radley, R. A.; Holl, F. B. Inoculation of Conifer Seed with Plant Growth

Promoting *Bacillus* Strains Causes Increased Seedling Emergence and Biomass. *Soil Biol. Biochem.*, v. 23, n. 6, p. 575-580, 1991.  
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90115-Z](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90115-Z)

Cooper, D.G.; Macdonald, C.R.; Duff, S.J.B; Kosaric, N., Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 408, 1981.

Davey, M.E.; Caiazza, N.C.; O'Toole, G.O. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture. *Journal Bacteriol*, v.185, p. 1027-1036, 2003.  
<https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003>

DELCAMBE, L. e DEVAGNAT, R. L'iturine, nouvel antibiotique d'origine congolaise. *Académie royale des sciences coloniales*, v. 6, p. 1-77, 1957.

Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineu, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquot, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus Subtilis*. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, p. 3-10, 1999.  
[https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00627-X](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00627-X)

Desai, J.D.; Banat, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, p.47-64, 1997.

Dieckmann, R.; Pavela-Vrancic, M.; Dohren, H. Synthesis of (di) adenosine polyphosphates by non-ribosomal peptide synthetases (NRPS). *Biochimica et Biophysica Acta*, Netherlands, v. 1546, p. 234-241, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00146-7)

Du Noüy, P.L. An Interfacial Tensiometer for Universal Use. *The Journal of General Physiology*, v. 7, p. 625-633, 1925.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.7.5.625>

Etchegaray, A.; Rabello, E.; Dieckmann, R.; Moon, D.H.; Fiore, M.F.; Von Döhren, H.; Siu, M.T.; Neilan, B. A., Algicide production by the filamentous cyanobacterium *Fischerella* sp.



CENA 19. Journal of applied phycology, V. 16(3), P. 237-243, 2004.  
<https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000048509.77816.5e>

Etchegaray, A.; De Castro Bueno, C.; De Melo, I.S.; Tsai, S.M.; De Fátima Fiore, M.; Silva-Stenico, M.E.; De Moraes, L.A.B.; Teschke, O., Effect of highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells. Archives of microbiology, V. 190(6), p. 611-622, 2008.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-008-0409-z>

Felix, A.K.N. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju. 103 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

Fernandes, P.A.V., Produção, extração e caracterização de surfactante por *Bacillus subtilis* R14. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, Recife, 2006.

Flasz, A.; Rocha, C.A.; Mosquera, B.; Sajo, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. Medical Science Research, v. 26(3), p.181-185, 1998.

Fox, S. L.; Bala, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. Bioresource Technology, v.75, p. 235-240, 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00059-6)

Freitas De Oliveira, D.W.; Lima França, Í. W.; Nogueira Félix, A. K.; Lima Martins, J.J.; Aparecida Giro, M.E.; Melo, V.M.M.; Gonçalves, L.R.B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 101, p. 34-43, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.011>

Gallert, C.; Winter, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. Naturwissenschaften, v. 89, n. 11, p. 483-496, 2002.  
<https://doi.org/10.1007/s00114-002-0372-5>

Guo, B., Wang, Y., Sun, X. & Tang, K. 2008. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 136-142.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683808020026>

Harris, D.C. *Análise Química Quantitativa*. 6ª ed Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 876p., 2005.

Hester, S. IB mMarket forecast. *Industrial Bioprocessing*, v. 23, n.5, p. 3, 2001.

Hiraoka, H. et al. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, Coproducer of Peptide Antibiotics Iturin A and Surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 38, p. 635-640, 1992.  
<https://doi.org/10.2323/jgam.38.635>

Horowitz, S.; Gibert, J.N.; Griffin, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 6(4), p. 243-248, 1990.

Kieran, P. M.; Macloughlin, P. F.; Malne, D. M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, v. 59, p. 39-52. 1997.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00163-6)

Kosaric, N.; Cairns, W.L.; Gray, N.C.C. Biosurfactants and biotechnology. *Surfactant Science Series*, v. 25, p. 247-331, 1987.

Kosaric, C.N. *Biosurfactants: production, properties and applications*. Canada, Marcel Dekker, 1993.

Kracht, M.; Rokos, H.; Özel, M.; Kowall, M.; Pauli, G.; Vater, J. Antiviral and hemolytic activities of Surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 52(7), 613-619, 1999.  
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.613>

Lang, S. Biological amphiphiles microbial biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7, 12-20, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00007-9)

Lin, S.C. Biosurfactant: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 66, p. 109-120, 1996.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199606\)66:2<109::AID-JCTB477>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199606)66:2<109::AID-JCTB477>3.0.CO;2-2)

Lin, H. Y.; Rao, Y. K.; Wu, W. S.; Tzeng, Y. M. Ferrous ion enhanced lipopeptide antibiotic iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128. *International Journal of Applied Science and Engineering*. v. 5, p. 123-132, 2007.

Luz, W. C. Rhizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas e de Bioproteção. *RAPP*, v.4, p. 1-49, 1996.

Maget-Dana, R. E PEYPOUX, F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. *Toxicology*. v. 87, p. 151-174, 1994.  
[https://doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0300-483X(94)90159-7)

Mariano, R. L. R., et al. Biocontrole de Doenças de Plantas. In: SEMANA DE FITOSSANIDADE, 2000, Recife. Livro de Palestra e Mini Cursos - Desafios no Manejo Integrado de Pragas e Doenças. Recife: UFPE, 2000. p 78-111.

Melo, I. S. Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; MIRELES, JR-H.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183, 5848-5854, 2001.  
<https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001>

MIRELES, JH-H.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183, 5848-5854, 2001.  
<https://doi.org/10.1128/JB.183.20.5848-5854.2001>

Monteiro, L.; Mariano, R. L. R.; Souto-Maior, A.M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.48, n. 1, p. 23-29, 2005.  
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000100004>

Moran, S.; Rai, D. K.; Clarck, B. R.; Murphy, C. D. Precursor-directed biosynthesis of fluorinated iturin A in *Bacillus* spp. Organic and Molecular Chemistry, v. 7, p. 644-646, 2009.  
<https://doi.org/10.1039/b816345f>

Moyne, A. L.; Shelby, R.; Cleveland, T. E.; Tuzun, S. Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. Journal of Applied Microbiology. v. 90, p.622-629, 2001.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x>

Mukherjee, A. K.; Das, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. FEMS Microbiology Ecology, v. 54, p. 479-489, 2005.  
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.06.003>

Mullican, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineering Geology, v. 60, p. 371, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4)

Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution, v. 133, p. 183-198, 2005.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>

Nitschke, M.; Haddad, R.; Costa, G.N.; Gilioli, R.; Meurer, E.C.; Gatti, M.S.V.; Eberlin, M.N.; Höehr, N.F.; Pastore, G.M. Structural Characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. Food Science and Biotechnology, 13, 591-596, 2004.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, p.772-776, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Biocresource Technology*, 97, 336-341, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.044>

Oku, H. Basic Principals of Plant Disease Control. In: OKU, H. Plant Pathogenesis and Disease Control. New York: CRC Press, INC., 1994. p. 1-2.

Oliveira, F.H.P.C. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos. Dissertação de mestrado, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, 60 p, 2006.

Phae, C. G.; Shoda, M.; Nobuhiro, K.; Nakano, M.; Ushiyama, K. Biological control of crown and root and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Annals of Phytopathology Society*. v. 58, p. 329-339, 1992.  
<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.58.329>

Patel, M.N.; Gopinathan, K.P. Lysozyme-sensitive bioemulsier for immiscible organophosphorus pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1224-1226, 1986.

Pauli, G.; Vollenbroich, D.; Özel, M.; Vater, J. Antimycoplasma properties and application on cell cultures of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus Subtilis*. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 44-49, 1997.

Pereira, J.F.; Gudiña, E.J.; Costa, R.; Vitorino, R.; Teixeira, J. A.; Coutinho, J.A.; Rodrigues, L.R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, v.111, p. 259-268, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040>

PERFUMO, A.; SMYTH, T.J.P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hudrophobic Substrates. K. N. Timmis (ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 09 p.,

1502-1510, 2010.

Piróllo, M.P.S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Rio Claro – São Paulo, 2006.

Radhika, C., Yao, J., Masakorala, K., Jain, A.K., Kumar, R. Enhanced production and characterization of biosurfactant produced by a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* USTBb using response surface methodology. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3, 66–80, 2014.

Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Hbid, C.; Jacques, P.; Destain, J.; Thonart, P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. v. 639, p. 81-85, 1993.  
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83091-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83091-6)

Ron, E.Z.; Rosemberg, E. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3, 229-2362, 2001.  
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>

Saikkonen, K. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, 21: 67-74, 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.001>

Satpute, S.K.; Banat, I.M.; Dhakephalkar, P.K.; Banpurkar, A.G.; Chopade, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, Adv. 28, 436-450, 2010.

Shahidzadeh, N.; Bonn, D.; Meunier, J.; Nabavi, M.; Airiau, M.; Moryan, M. Dynamics of Spontaneous Emulsification for Fabrication of Oil in Water Emulsions. *Langmuir*, 16, p. 9703-9708, 2000.  
<https://doi.org/10.1021/la000493l>

Singh, P.; Cameotra, S.S. Potential application of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, v.22, n.3, p.142-146, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>

Singh, A.; Van Hamme, J.D.; Ward, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology, *Biotechnology Advances*, v.25, p. 99-122, 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.10.004>

Sivapathasekaran, C.; Mukherjee, S.; Ray, A.; Gupta, A.; Sen, R. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. *Bioresource Technology*, 101, 2884-2887, 2010.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.093>

Skorniyakov, I. V.; Tolstorozhev, G.B.; Butra, V.A. "Infrared Absorption Spectra of Human Malignant Tumor Tissues." *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 75, p.420-425, 2008.  
<https://doi.org/10.1007/s10812-008-9062-1>

Soberón-Chávez, G.; Maier, R.M. Biosurfactans: a General Overview. In *Biosurfactants*, Soberón-Chávez, G., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, p.1-11, 2011.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_1)

Soares, D.W.F. Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus* sp. isoladas de estação de tratamento de águas residuais e de solos de manguezais (Ceará – Brasil). Dissertação (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2014.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MAGET-DANA, R.; ROUX, B.; MICHEL, G. Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and applied biochemistry*.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT HIBRAHIM, M. Effect of Biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Korynebacterium kutcheri* and *Pseudomonas aeruginosas*. *Bioresource Technology*, Cdoi:10.1016/j.biortech.2018.08.099, (2010).

Toure, Y. et al. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of

grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 96, p. 1151-1160, 2004.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>

Vater, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. *Program Colloid & Polymer Science*, 72, 12-18, 1986.

Vater, J.; Kablitz, B.; Wilde, C.; Franke, P.; Mehta, N.; Cameotra, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass Spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus Subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied Environmental Microbiology*, 68(12), 6210-6219, 2002.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>

Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, v.24, p.604-620, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.08.001>

Vass, E.; Besson, F.; Majer, Z.; Volpon, L.; Hollósi, M. Ca<sup>2+</sup> Induced changes of surfactin conformation: A FTIR and circular dichroism study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 361-367, 2001.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4469>

Vollembroich, D.; Özel, M.; Vater, J.; Kamp, R.M.; Pauli, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25, 289-297, 1997.  
<https://doi.org/10.1006/biol.1997.0099>

Wei, Y.H.; Chu, I.M. Mn<sup>2+</sup> improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, v. 24, p. 479-482, 2002.  
<https://doi.org/10.1023/A:1014534021276>

Weller, D. M. Biological Control of Soilborn Plant Pathogens in The Rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, v. 26, p. 379-407, 1988.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188.002115>



WELKER, N.E.; CAMPBELL, L.L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, v. 94, p. 1124-1130, 1967.

YAMANE, Enzyme technology for the lipid industry: an engineering overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 1657-1662, 1987.  
<https://doi.org/10.1007/BF02542499>

Yan, Z.; Qun, W.; Yan, C. Production of surfactin from waste distiller's grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresource Technology*, v. 235, p. 96-103, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090>

Yeh, M. H.; Wey, Y. H.; Chang, J. S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1799-1805, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.027>

Yoshida, S. et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Biological Control*, Orlando, v. 91, p. 181-187, 2001.

Yu, G. Y.; Sinclair, J. B.; Hartman, G. L.; Bertagnolli, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 34, p. 955-963, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5)

ZENG, X. T.; XU, Y. Z.; ZHANG, X. Q.; XU, Z.; ZHANG, Y.F.; WU, J.G.; ZHOU, X. S.; LING, X. F. "FTIR spectroscopic explorations of freshly resected thyroid malignant tissue", *Spectroscopy and Spectral Analysis*, v. 27, 2007.

Zhi, Y.; Wu, Q.; Xu, Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Sci. Rep.* 7, 40976, 2017.  
<https://doi.org/10.1038/srep40976>