

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

ANA PAULA PEREIRA DOS SANTOS

**Produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp.
isolado de líquens da Região Amazônica para aplicação
como agente antifúngico**

**RECIFE
2013**

ANA PAULA PEREIRA DOS SANTOS

**Produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp.
isolado de líquens da Região Amazônica para aplicação
como agente antifúngico**

RECIFE

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ANA PAULA PEREIRA DOS SANTOS

**Produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp.
isolado de líquens da Região Amazônica para aplicação
como agente antifúngico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal como pré-requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientadora: **Prof^a. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto**

Co-Orientadora: **Prof^a. Dra. Leonie Asfora Sarubbo**

RECIFE

2013

Ficha catalográfica

S237p Santos, Ana Paula Pereira dos
Produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. isolados de líquens da região amazônica para aplicação como agente antifúngico / Ana Paula Pereira dos Santos. -- Recife, 2013.
97 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Surfactante 2. Bioemulsificante 3. Tensão superficial
4. Moléculas antifilicas I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo,
orientadora II. Título

CDD 636.089

ANA PAULA PEREIRA DOS SANTOS

Produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. isolado de líquens da Região Amazônica para aplicação como agente antifúngico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biociência Animal.

Dissertação defendida 28 de fevereiro de 2013.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra Leonie Asfora Sarubbo
UNICAP/ CCT

Dra. Raquel Diniz Rufino
UNICAP/CCT

Dra. Cynthia de Oliveira Nascimento
UFRPE/PPGBA

Dr. Eduardo Francisco dos Santos
IFPE/CVSA

DEDICATÓRIA

Ao Soberano Deus Criador.

Ao meu Senhor Jesus Cristo e ao divino Espírito Santo.

Em especial a minha querida mãe Amara Geni "*in memoriam.*"

Ao meu Pai querido e toda minha Família pelo apoio ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela sua infinita graça e misericórdia que se renova em minha vida cada amanhecer.

Aos meus pais, Eliaquim e Amara Geni (*in memóriam*) e aos meus irmão e irmãs, que são especiais. Sou grata a Deus pela minha família amor incondicional e eterno.

Ao Sr. Walter Augusto, Sra. Wanda e Júnior pelo carinho e hospitalidade sem igual.

Agradeço a dois anjos, encaminhados por Deus, dotadas do saber divino, exemplos de educadoras cientistas dedicadas e além de tudo trata seus alunos com um coração de mãe, são as minhas Professoras Ana Porto (UFRPE) e Leonie Asfora Sarubbo (UNICAP). Sou grata pela orientação, compreensão e por todo processo de formação acadêmica, que me fez amadurecer e crescer profissionalmente. Por me fazer acreditar que sou capaz. MUITO OBRIGADA!

A Prof^a. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira, por ter cedido à coleção de micro-organismos pertencente ao DPUA, da Universidade Federal do Amazonas.

A Prof^a. Dra. Ana Beatriz Seteiro Siqueira, pertencente ao Depto. de Farmácia (UFPE) pela contribuição nas informações passadas na atividade antifúngica.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Biociência Animal, que contribuíram com a minha formação acadêmica.

A todos que compõem o grupo de pesquisa da Professora Ana Porto na UFRPE, dos laboratórios Labtecbio e Cenapesq (IC, Mestrandos, Doutorandos e Pós-doutores, Dra. Polyanna Nunes, Dr. Romero e Dra. Camila Porto e a Dra. Cynthia de oliveira.

As mestrandas Programa Biociência Animal: Michelly, Meyre e a doutoranda Milena Fernandes (UFPE), por estarem comigo no dia-a-dia, em momentos de estresse, desânimo, e principalmente de muita alegria.

A Edberg Costa (UFRPE- Doutorando/Biofísica), seu apoio e colaboração foram de suma importância.

Pelo carinho das técnicas Iêda (Labtecbio) e Patrícia (Cenapesq).

Ao Dr. Eduardo Francisco dos Santos pela colaboração na banca examinadora na qualificação e defesa.

Ao Prof. Clécio Souza Ramos (DCM/UFRPE), pela colaboração e apoio na finalização de uma etapa desafiadora deste trabalho.

Ao mestrando Rodolfo que compõem o grupo de pesquisa do Dpto. de química na UFRPE.

A Prof^a. Dra. Juliana Luna e em especial a Prof^a. Dra. Raquel Diniz Rufino que me acolheu e auxiliou a guiar este trabalho de forma especial pela dedicação e responsabilidade.

Pela colaboração especial do Prof. Valdemir Alexandre dos Santos (UNICAP- Laboratório Centro de Ciências e Tecnologia).

A todos que compõem o grupo de pesquisa da Professora Leonie Asfora Sarubbo da Universidade Católica de Pernambuco do Laboratório do Centro de Ciências e Tecnologia (IC, Mestrandos, Doutorandos e Pós-doutores).

Algumas vezes na vida, você encontra uma amiga especial. Alguém que te faz rir até você não poder mais parar. Sua amiga pra sempre te ajuda nas horas difíceis, tristes e confusas e também nos momentos de muita alegria!

A você Mitaliene de Deus, obrigada pela colaboração e carinho por passarmos junta essa jornada.

A Universidade de Pernambuco – UPE, pelo apoio sem medida para realização deste curso de Pós-graduação. Obrigada pela valiosa oportunidade. Amo meu trabalho, presente de Deus.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv

CAPÍTULO I

RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Biossurfactantes	23
3.1.1 Classificação química dos biossurfactantes	23
3.1.2 Produção dos biossurfactantes	26
3.1.3 Aplicações dos biossurfactantes	27
3.1.4 Micro-organismos produtores de biossurfactantes	29
3.1.5 Actinomicetos	31
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO II

Produção e caracterização do biossurfactante por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT	42

1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Micro-organismo	45
2.2 Meios de esporulação e manutenção.....	45
2.3 Seleção do meio de produção de acordo com o planejamento fatorial 2 ² para produção do biossurfactante	45
2.4 Cinética de crescimento e produção do biossurfactante	46
2.5 Determinação da biomassa	46
2.6 Extração e isolamento do biossurfactante produzido	46
2.7 Determinação da tensão superficial	47
2.8 Tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)	47
2.9 Índice de Emulsificação (IE ₂₄)	47
2.10 Avaliação da estabilidade do biossurfactante frente a condições ambientais extremas de pH, temperatura e concentração de NaCl.	47
2.11 Determinação da toxicidade do biossurfactante frente ao micro- crustáceo <i>Artemia salina</i>	48
2.12 Determinação da fitotoxicidade do biossurfactante frente às sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) e repolho (<i>Brassica oleracea</i> L.)	48
3 Caracterização do biossurfactante produzido	49
3.1 Composição química do biossurfactante.....	49
3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	49
3.3 Espectrometria de infravermelho.....	50
3.4 Teste de dispersão e agregação de óleo	50
3.5 Análises estatísticas dos resultados	50
3.5.1 Delineamento composto central como ferramenta estatística para produção de bioprocessos	50

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Resultado do planejamento experimental	50
4.2 Cinética de crescimento e produção do biossurfactante de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559	57
4.3 Determinação do índice de emulsificação em diferente compostos hidrofóbicos	59
4.4 Cinética do índice de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559, após 120 horas de cultivo	61
4.5 Concentração Micelar Critica (CMC)	62
4.6 Avaliação da estabilidade do biossurfactante frente a condições ambientais extremas de pH, temperatura, concentração de NaCl	63
4.7 Determinação da toxicidade do biossurfactante frente ao micro- crustáceo <i>Artemia salina</i>	66
4.8 Determinação da fitotoxicidade do biossurfactante frente às sementes vegetais de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) e repolho (<i>Brassica oleracea</i> L.)	67
5 Caracterização do biossurfactante do <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559.....	68
6 Teste de dispersão e agregação de óleo	72
7 Conclusão	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

CAPITULO III

Avaliação da atividade biológica do tensoativo produzido por <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica frente às linhagens <i>Microsporium canis</i> isolados de micoses superficiais de cães	79
RESUMO	80
ABSTRACT	81
1 INTRODUÇÃO	82

2 MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1 Micro-organismo e manutenção	83
2.2 Meio de produção	83
2.3 Isolamento do biossurfactante	83
2.4 Micro-organismo	84
2.5 Meio de cultura	84
2.6 Extrato do biossurfactante	84
2.7 Preparação do inóculo.....	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4 CONCLUSÃO	89
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
APÊNDICE.....	93
1 – Comprovante do certificado do Congresso Latino-americano, Santos, São Paulo	94
2 – Comprovante do certificado do Simpósio V Sicbio 2012, na Universidade Federal de Pernambuco	95
3 – XIª Reunião Regional Nordeste da SBBq e IV th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology	96

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Ilustração dos biossurfactantes se acumulando na interface entre líquido e ar, fonte: PACWA-PŁOCINICZAK et al. (2011) 22
- Figura 2.** Ilustração da relação da concentração do biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas, fonte: PACWA-PŁOCINICZAK et al. (2011) 23
- Figura 3.** Ilustração das estruturas químicas de alguns tipos de biossurfactantes, fonte: DESAI; BANAT (1997) 24
- Figura 4.** Ilustração das subdivisões das espécies químicas de surfactantes, Fonte: <http://www.infoescola.com/quimica/sistema-anfifilico>, acessado em 10 de dezembro de 2012 25
- Figura 5.** Ilustração do *Streptomyces* sp. DPUA1559 esporulando na superfície em meio agar ISP-2, fonte: a autora 32

Capítulo II

- Figura 1.** Diagrama de Pareto mostrando os efeitos individuais e combinados de pH (X_1) e temperatura (X_2) e quadráticos da temperatura (X_2^2) e do pH (X_1^2) sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação 54
- Figura 2.** Superfície de resposta apresentando os efeitos do pH e da temperatura sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação ... 55

Figura 3. Curvas de nível associadas aos efeitos de pH e temperatura sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. PUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação.....	56
Figura 4. Cinética de crescimento, pH, tensão superficial e produção do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 120 horas de fermentação.....	58
Figura 5. Índice de emulsificação em líquido metabólico do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a diferentes compostos hidrofóbicos como querosene (Q), óleos de motor (OMO), óleo de motor residual (OMR), diesel (ODI), óleo de milho (OMI), óleo de canola (OCA), óleo de soja (OSO) e óleo de girassol (OGI).	60
Figura 6. Cinética do índice de emulsificação no líquido metabólico livre de células do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 120 horas de fermentação frente aos compostos hidrofóbicos óleo de motor residual, óleo de motor, óleo vegetal de soja e óleo vegetal de girassol	61
Figura 7. Valores de Tensão superficial e concentração micelar crítica do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação	63
Figura 8. Influência do pH na estabilidade do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 no líquido metabólico em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a valores de tensão superficial em líquido metabólico produzido por <i>Streptomyces</i> sp DPUA1559 após 96 horas de fermentação. ...	64

Figura 9. Influência da temperatura na estabilidade do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 no líquido metabólico em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a valores de tensão superficial em líquido metabólico produzido por <i>Streptomyces</i> sp DPUA1559 após 96 horas de fermentação	65
Figura 10. Influência da concentração de NaCl na estabilidade do biossurfactante produzido de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 no líquido metabólico em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a valores de tensão superficial em líquido metabólico produzido por <i>Streptomyces</i> sp DPUA1559 após 96 horas de fermentação.....	66
Figura 11. Ilustração da fitotoxicidade em líquido metabólico do biossurfactante isolado de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 frente às sementes vegetais de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.) e repolho (<i>Brassica oleracea</i> L.)	68
Figura 12. Caracterização molecular do biossurfactante isolado de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559: (A) proteína marcador padrão utilizada como se segue: albumina de soro bovino (65 kDa); albumina de ovo de galinha branca (45 kDa); anidrase carbônica (29 kDa) e lisozima (14,7 kDa). (B) 11,5% de SDS-PAGE da proteína corada com Coomassie. (C) de 11,5% SDS-PAGE da proteína reduzindo condição com 2-mercaptoetanol e (D) à condição de não redução	69
Figura 13. A A análise preliminar dos espectros com os principais grupos funcionais apresentados por biossurfactante isolado de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 e pelo método FIR-ATR	71
Figura 14. Ilustração da dispersão e agregação do óleo de motor após a adição do biotensioativo de <i>Streptomyces</i> sp. DPUA1559 cultivado em meio mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação	72

Capítulo III

Figura 1. Ilustração da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às linhagens de *Microsporum canis* isolados de casos de micose superficial de cães. 86

Figura 2. Ilustração da atividade fungicida (CFM) do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às linhagens de *Microsporum canis* isolados de casos de micose superficial de cães: *M. canis* 2 (a), *M. canis* 3 (b), *M. canis* 14 (c), *M. canis* 14a (d), *M. canis* 15 (e), *M. canis* 16 (f) e *M. canis* 17 (g)..... 87

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Aplicações biológicas e biotecnológicas dos biossurfactantes 29

Tabela 2. Micro-organismos utilizando diferentes fontes de carbono na produção de biossurfactante 31

Capítulo II

Tabela 1. Valores das variáveis codificadas e reais para o DCCR adotado. ... 46

Tabela 2. Resultado do planejamento e DCCR aos dados experimentais propostos para produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação 52

Tabela 3. Análise de Variância para a tensão superficial do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação 53

Tabela 4. Composição química e caracterização molecular do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA155970

Tabela 5. Análise dos picos espectrais característicos do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 pelo método de FIR-ATR 70

Capítulo III

Tabela 1. Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da atividade antifúngica do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às linhagens de *Microsporum canis*..... 88

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas produzidas por micro-organismos que consistem em uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. A porção hidrofílica é constituída por mono-oligo ou polissacarídeos, peptídeos ou proteínas e a porção hidrofóbica contém saturado, insaturado e hidroxilados de ácidos graxos ou álcoois. Muitos micro-organismos produzem surfactantes com atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiparasitária e herbicida com uso na medicina e agricultura. Neste sentido, a produção de um biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado da Região Amazônica, cultivado em meio contendo óleo de soja residual de fritura e peptona, foi realizada utilizando-se um planejamento fatorial 2^2 para verificar os efeitos e interação sobre as variáveis resposta tensão superficial, índice de emulsificação e rendimento de produção. A produção do biossurfactante foi confirmada pela redução da tensão superficial. A concentração micelar crítica (CMC) foi de 10 mg/ml e a média da tensão superficial no ponto central foi em torno de 25,34 mN/m com um rendimento de 1,17 g/l. O biossurfactante produzido apresentou índice de emulsificação 89% para óleo de motor e 95% óleo de motor residual. O querosene apresentou uma emulsificação de 40%, enquanto o óleo diesel não foi efetivamente emulsificado. Para os óleos vegetais (milho, canola, soja e girassol) a emulsão formada foi em torno de 47%. O biossurfactante produzido mostrou estabilidade quando submetido a condições ambientais extremas de pH, temperatura e concentração de NaCl e não apresentou toxicidade quando testado frente ao micro-crustáceo *Artemia salina* e às sementes dos vegetais alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.). A análise da caracterização da biomolécula demonstrou na sua composição química 20% de proteína e 38% de carboidrato. Na caracterização molecular em eletroforese de gel de poliacrilamida SDS-PAGE o biossurfactante mostrou uma única banda proteica 14,3 kDa e caráter ácido. A análise espectral pelo método FT-IR-Atr revelou uma estrutura química composta basicamente por peptídeos, com polaridades diferentes. As linhagens de *Microsporum canis* isolados de micoses superficiais de cães foram susceptíveis na presença do biossurfactante isolado, apresentando uma inibição de crescimento a partir da concentração de 1,9 a 1000 µg/ml.

Palavras-chave: Biossurfactante. Produção. *Streptomyces*. peptídeos. *Microsporum canis*.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic molecules produced by micro-organisms that consist of a hydrophilic portion and a hydrophobic portion. The hydrophilic portion consists of mono-oligo-or polysaccharides, proteins or peptides and the hydrophobic portion contains saturated, unsaturated and hydroxy fatty acids or alcohols. Many micro-organisms produce surfactants with antibacterial, antifungal, antitumor, antiparasitic and herbicide use in medicine and agriculture. In this sense, producing a biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolated Amazon region, grown in medium containing soybean oil and waste frying peptone was performed using a 2² factorial design to investigate the effects and interactions on the response variables surface tension, emulsification index and production yield. The production of the biosurfactant was confirmed by reduction of surface tension. The critical micelle concentration (CMC) was 10 mg/ml and the average surface tension at the focal point was about 25,34 mN/m in a yield of 1,17 g/l. The isolated biosurfactant showed emulsification index 89% to 95% engine oil and engine oil residual. The kerosene emulsification showed a 40%, while the diesel oil was not emulsified effectively. For vegetable oils (corn, canola, soybean, and sunflower) emulsion was formed around 47%. The isolated biosurfactant was stable when subjected to extreme environmental conditions of pH, temperature and NaCl concentration and showed no toxicity when tested against the micro-crustacean *Artemia salina* and seeds of vegetables lettuce (*Lactuca sativa* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). The characterization of biomolecule analysis demonstrated the chemical composition of 20% protein and 38% carbohydrate. Molecular characterization on polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE showed the biosurfactant a single protein band and 14.3kDa character acid. The spectral analysis method by FT-IR-Atr revealed a chemical structure composed mainly of peptides with different polarities. The strains of *Microsporum canis* isolates from dogs superficial mycoses were susceptible in the presence of biosurfactant isolated presenting a growth inhibition at concentrations of 1.9 to 1000 µg/ml.

Keywords: Biosurfactant. Production. *Streptomyces*. Peptides. *Microsporum canis*.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, diversos micro-organismos têm sido relatados como potenciais produtores de vários tipos de compostos bioativos. Dentre esses produtos se destacam os biossurfactantes sintetizados a partir de bactérias, fungos e leveduras (SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006; BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008; ZHAO; SELVAM; WONG, 2011; RUFINO et al., 2011).

Os biossurfactantes são moléculas capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial estabilizando a solução pela formação de microemulsões. Um dos desafios na síntese desses biotensioativos encontra-se na redução dos custos de produção, extração, purificação e caracterização para comercialização em relação aos surfactantes sintéticos (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; WINTERBURN; RUSSELL; MARTIN, 2011; XIA et al., 2011; VAZ et al., 2012).

Os biossurfactantes podem ser obtidos a partir de matérias-primas renováveis como milhocina e resíduos de processamento vegetal. A maior vantagem em desenvolver surfactantes microbianos está baseada na capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial comparados aos surfactantes químicos. Além disso, apresentam menos toxicidade, fácil decomposição e maior tolerância às variações de fatores como temperatura e pH (MUKHEJEE; DAS; SEN, 2006; RUFINO et al., 2011; LUNA et al., 2013).

A otimização das condições na produção em escala industrial ainda é uma possível alternativa na competição dos surfactantes microbianos frente aos sintéticos. Alguns óleos vegetais, como óleo residual de refinaria, óleo de soja e borra de óleo de amendoim, têm sido usados na produção de biossurfactantes em pesquisas como um meio viável de baixo custo (KIRAM et al., 2009; RUFINO et al., 2011; GOMES; NITSCHKE, 2012; THAVASI; JAYALASHMI; BANAT, 2011; JARA et al., 2013).

Considerando a possibilidade em reutilizar subprodutos de origem industrial na produção de novos surfactantes de origem microbiana com propriedades e compatibilidades ambiental, foi realizado um estudo a partir da produção e caracterização do biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de

liquens da Região Amazônica. O estudo foi baseado inicialmente na utilização de um planejamento fatorial para avaliar os efeitos sobre a produção do biossurfactante. Em seguida, o biossurfactante foi caracterizado e testado como agente antifúngico frente as linhagens de *Microsporum canis* e suas propriedades tensoativas foram submetidas a condições ambientais extremas de pH, temperatura e salinidade, e sua toxicidade avaliada frente ao micro-crustáceo *Artemia salina* e a sementes vegetais de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar o biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica e avaliar a biomolécula como potencial agente antifúngico.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar os parâmetros de temperatura e pH para produção do biossurfactante utilizando um planejamento fatorial 2^2 .
- Avaliar a melhor condição de interação das variáveis para produção do biossurfactante.
- Avaliar a cinética de crescimento e produção do biossurfactante.
- Determinar a concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante produzido.
- Determinar o índice de emulsificação frente a diferentes compostos hidrofóbicos.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante frente a condições ambientais extremas de pH, temperatura e concentrações de NaCl.
- Determinar a toxicidade do biossurfactante frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.
- Determinar a fitotoxicidade do biossurfactante frente às sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.).
- Caracterizar o biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica.
- Avaliar a atividade antifúngica do biossurfactante produzido frente às linhagens de *Microsporum canis* isolados de micoses superficiais de cães.

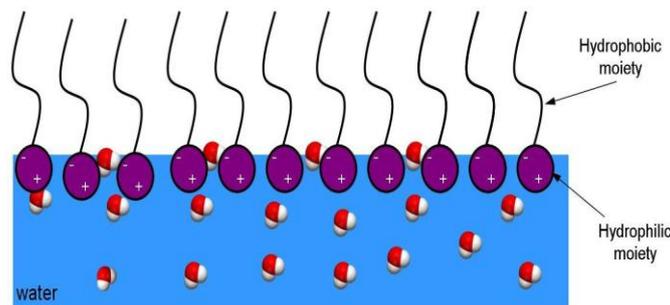
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são substâncias bioativas sintetizadas por vários microorganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SARAVANAKUMARI; MANI, 2010). A maioria dos surfactantes utilizados comercialmente é de origem petroquímica, e geralmente pode causar danos ao ambiente, o que impulsionou a procura de diferentes tipos de matéria-prima para produzir biossurfactantes com características tensoativas, propriedades físico-químicas e aceitação ecológica (LUNA; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2009; BANAT, et al. 2010; RUFINO et al., 2011).

Os biossurfactantes são compostos constituídos por moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial dos líquidos atuando entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio. A força de coesão entre as moléculas comporta-se em direcionamento saturando toda a interface pela formação de microemulsões (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; ABOUSEOUD et al., 2008; RUFINO et al., 2011). A Figura 1 ilustra a redução da superfície (líquido-ar) e interfacial (líquido-líquido), que reduzem a tensão das forças de repulsão entre duas fases diferentes permitindo a interação das duas fases (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Figura 1 – Ilustração dos biossurfactantes se acumulando na interface entre líquido e ar

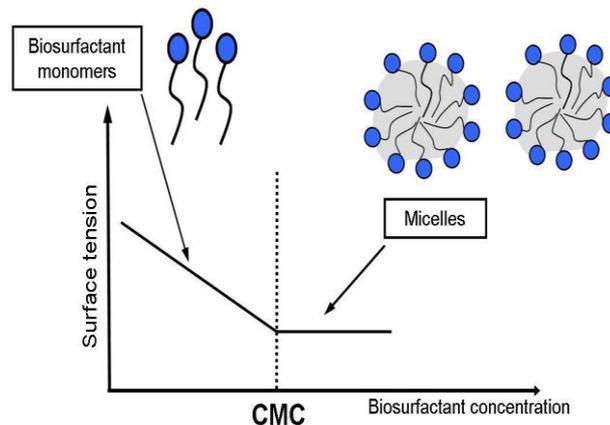


Fonte: PACWA-PŁOCINICZAK et al. (2011).

Em um sistema o aumento da concentração dos biossurfactantes diminui a tensão superficial do meio até alcançar concentração micelar crítica (CMC), ocorrendo a formação de micelas e vesículas, que é a capacidade de reduzir ao máximo a menor tensão, sendo usada para medir a eficiência do surfactante. A

Figura 2 ilustra a formação de micelas que auxiliam na formação das microemulsões (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Figura 2 – Ilustração da relação da concentração do biossurfactante, tensão superficial e formação de micelas



Fonte: PACWA-PŁOCINICZAK et al. (2011).

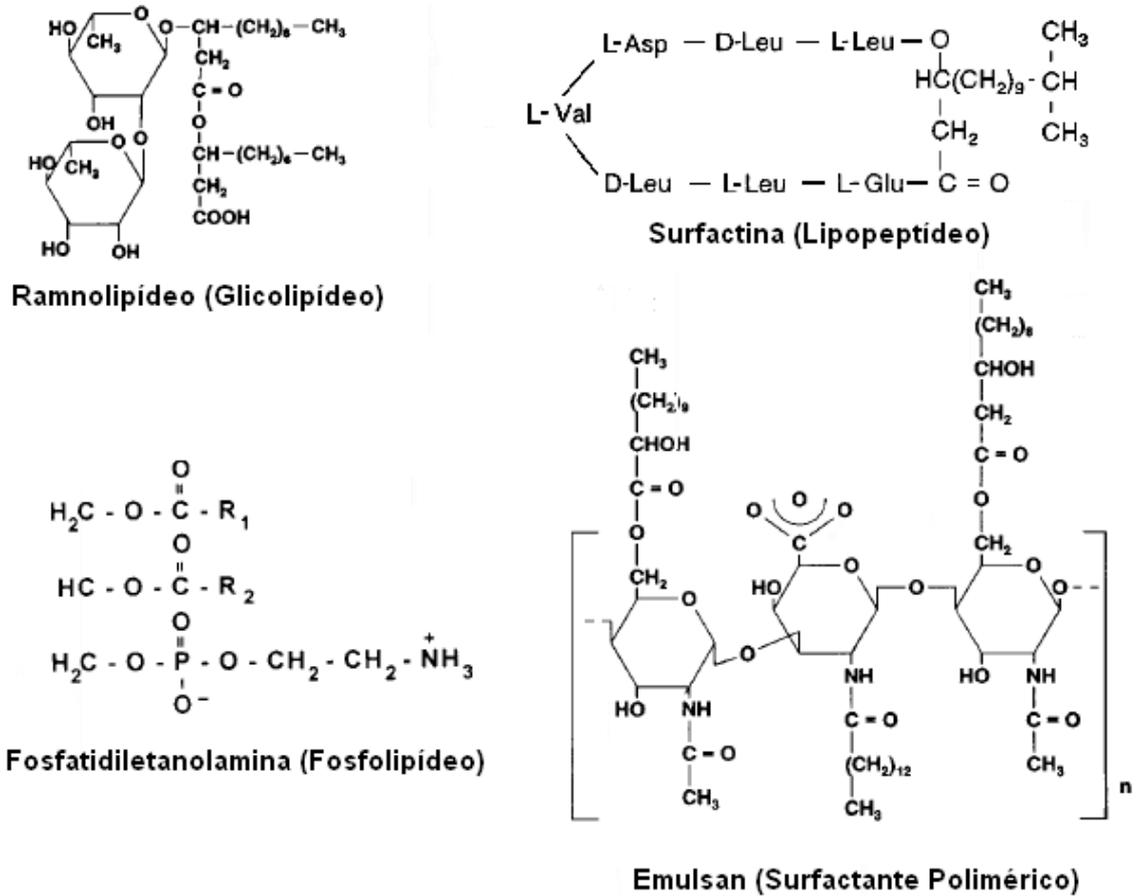
3.1.1 Classificação química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são moléculas que formam emulsões em misturas de óleo e água. As propriedades e características são influenciadas pela natureza das fontes de carbono, nitrogênio e elementos minerais, que determina a sua composição química e estrutura (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; RUFINO et al., 2011; LUNA et al., 2011; GOMES; NITSCHKE, 2012).

Conforme Van-Dyke et al. (1991), os biossurfactantes são produzidos através das células microbianas, apresentando diferentes tamanhos de moléculas e propriedades químicas. As estruturas químicas são formadas por uma porção lipofílica, cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos e podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica. Dentre os biossurfactantes mais conhecidos, podemos destacar os glicolípídios (raminolípídios), lipopeptídios (surfactina), fosfolípídios (fosfatidiletanolamina) complexos de proteínas e polissacarídeos, ácidos graxos, lipídios neutros, surfactantes polímeros (emulsan) e surfactantes particulados (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; LANG, 2002; MUKHEJEE; DAS; SEN, 2006). Desta forma a Figura 3 mostra alguns biossurfactantes

conhecidos produzidos por diferentes micro-organismos.

Figura 3 – Ilustração das estruturas químicas de alguns tipos de biossurfactantes



Fonte: DESAI; BANAT, (1997).

A surfactina é um lipopeptídio produzido por *Bacillus subtilis*, contendo uma cadeia de treze a quinze átomos de carbono. A estrutura é composta por uma série de aminoácidos, dentre eles a L- Asparagina, L- Leucina, L- Glicina, L- Leucina, L- Valina e duas D- Leucinas. Algumas aplicações já foram realizadas com a surfactina em experimentos *in vivo* com ratos, apresentando excelente atividade toxicológica (RODRIGUES et al., 2006; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

Os biossurfactantes também são classificados em iônicos e não iônicos conforme a polaridade da parte hidrofílica, e poucos são catiônicos apresentando grupo amino (DESAI; BANAT, 1997), conforme a descrição a seguir:

- Catiônicos: são agentes formados por um ou mais grupamentos funcionais que, ao

variáveis e dependem diretamente da composição da mistura de substratos (KRIEGER; CAMILIOS NETO; MITCHELL, 2010).

3.1.2 Produção dos biossurfactantes

As bactérias produzem biossurfactantes através do metabolismo celular em restrição aos nutrientes como fonte de carbono e nitrogênio, ocorrendo a formação de moléculas tensoativas e micelas que se agregam no meio aquoso em uma determinada concentração. As funções da assimilação e degradação de compostos hidrofóbicos com produção de surfactantes extracelulares são processos que podem ocorrer em ambas as fases de crescimento exponencial e estacionária do micro-organismo, embora ainda esteja sendo elucidada a fisiologia desse mecanismo celular de produção (RON; ROSENBERG, 2001; SARRUBO; LUNA; CAMPOSTAKAKI, 2006).

As regiões hidrofóbicas são mantidas afastadas das moléculas de água, e interagem com a camada externa da micela, formada pelos grupos hidrofílicos do surfactante, e a liberação dessas moléculas é influenciada pela composição dos substratos e elementos minerais e pelos micro-organismos produtores (ABOUSEOUD et al., 2008; BORDOLOI; KONWAR, 2009). A atividade da tensão superficial é um trabalho necessário para aumentar a área de superfície e atração diferencial entre as moléculas localizadas na superfície. Gera uma resultante que aponta para o interior do líquido, resultando na adsorção destes compostos na superfície ou na interface entre dois líquidos imiscíveis (MULLIGAN, 2004).

Todavia, os processos industriais de produção e aplicação de biossurfactantes ainda precisam ser desenvolvidos devido ao seu alto custo da matéria-prima para produção e processos de purificação dessas moléculas para competir com os surfactantes sintéticos (ROCHA et al., 2006). O desenvolvimento de surfactantes menos tóxicos, biodegradáveis, como os biossurfactantes, é uma estratégia importante para a aquisição de compostos ambientalmente aceitáveis (LUNA et al., 2013).

A otimização dos processos de produção através de modelos estatísticos fatoriais pode reduzir os custos e ser empregada para a melhoria do agente

tensoativo emulsificante produzido, através de resíduos e subprodutos usados como substratos (RUFINO et al., 2008).

A concentração e o tipo de fonte de carbono utilizado podem ser fatores a interferir na quantidade do biossurfactante produzido. Muitos resíduos industriais, como óleo de palma, óleo de soja associado à milhocina e glicerol, foram utilizados (NAWAWI; JAMAL; ALAM, 2010; LUNA et al., 2011; VAZ et al., 2012).

Produções de biossurfactantes por bactérias do gênero *Streptomyces* têm sido pouco relatadas em relação a outros micro-organismos, embora já exista relatos com a bactéria *Streptomyces* sp. B3 isolada de ambientes marinhos (KHOPADE et al., 2012b). Outros micro-organismos foram reportados, como a levedura *Candida lipolytica* UCP0988, a *C. ephaerica* UCP0995 e o *Lactococcus lactis* and, *Pseudomonas fluorescens* UCP1514, entre outros (RUFINO et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; SARAVANAKUMARI; MANI, 2010; LIMA e SILVA et al., 2010).

3.1.3 Aplicações dos biossurfactantes

A aplicação dos biossurfactantes baseia-se na natureza e concentração dos substratos carbônicos que são utilizados influenciados na determinação da estrutura e aplicação (BANAT, et al. 2000). As principais propriedades dos biossurfactantes são: bioemulsificação, separação, redução na viscosidade de líquidos, redução na tensão superficial e interfacial, baixa concentração micelar crítica (CMC), tolerância a temperaturas extremas e força iônica solubilizante e estabilizante (NITSCHKE; PASTORE, 2002; DELEU; PAQUOT, 2004; MULLIGAN, 2004).

O interesse global em produzir surfactantes microbianos está correlacionado por eles apresentarem menos toxicidade e terem inúmeras aplicações comerciais, como nas indústrias e na agricultura para eliminação de patógenos de plantas e descontaminação de solo (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

Outras propriedades são encontradas na literatura, como detergência, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases, indústrias de produto de limpeza, recuperação do petróleo, produtos de higiene, tintas, agricultura, aderência-liberação da célula a superfícies e atividade antibiótica – solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas.

Alguns biossurfactantes em alimentos são utilizados em molhos e saladas como bioemulsificante ou retardante durante o processamento de pasteurização em indústrias de laticínios (BANAT, MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; NITSCHKE; PASTORE, 2002; DELEU; PAQUOT, 2004; DWORKIN et al., 2006; RUFINO et al., 2011).

Outros estudos mostram que peptídeos cíclicos são capazes de inativar as bactérias gram-positivas e gram-negativas através da incorporação de biossurfactantes, desestabilizando a camada lipídica e promovendo a ruptura de biofilmes, que podem levar à deterioração em alimentos. Alguns biossurfactantes apresentaram atividades anti-inflamatória e antimicrobiana frente a *Candida albicans*, *Streptococcus hemolítico*, *S. epidermidis*, *Enterococcus fecalis*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa* (KIRAN et al., 2009; RUFINO et al., 2011; GOMES; NITSCHKE, 2012).

Nesses últimos anos os biossurfactantes têm sido motivo de muitas pesquisas. De acordo com Araújo et al. (2011), moléculas tensoativas foram testadas, apresentando potencial inibidor de adesão frente à *Listeria monocytogenes*. Outras moléculas foram estudadas com interessantes propriedades terapêuticas na avaliação de efeitos citotóxicos, com efeito antitumoral frente a linfócitos humanos. Muitos biossurfactantes têm sido motivo de estudos com importância na área médica por apresentarem atividade antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008, PRIYA; USHARANI, 2009; CHEN et al., 2011; GEIN et al., 2011; RUFINO et al., 2011).

A necessidade atual de compostos biodegradáveis e biocompatíveis, para serem aplicados numa agricultura sustentável e atender a crescente demanda populacional, é uma preocupação mundial. A exploração do uso de biossurfactantes pode ser útil na melhoria da qualidade e produtividade agrícola e benefícios associados a esse contexto. Assim, estudos colaboram para o rastreamento das populações microbiana na biosfera de solo para investigar seu potencial em ambientes isolados e utilizar em aplicações na área agrícolas (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). A Tabela 1 apresenta algumas aplicações biológicas para biossurfactantes.

Tabela 1 – Aplicações biológicas e biotecnológicas dos biossurfactantes

Aplicações	Biossurfactantes	Referências
Inibição do biofilme e ação antimicrobiana	Lipopeptídio	Muthu et al. (2011)
Inibidor de secreção antiinflamatória e mediadores células RBL-2H3	Manosil-eritritol	Morita et al. (2011)
Potencial antimicrobiano e anti-adesivo	Rufisan	Rufino et al. (2011)
Inibição da adesão de <i>Listeria monocytogenes</i>	Ramnolipido e Surfactina	Araújo et al. (2011)
Efeitos da hidrofobicidade de superfície celular de PAH degradantes bactérias e biodegradação do fenantreno	Ramnolipidos	Zhao; Selvam; Wong, (2011)
Tratamento de incrustações de águas residuais com óleo de fritura	Ramnolipídios	Qin et al. (2012)
Solubilização de carvão e biorremediação de ambientes marinhos contaminado com óleo	Ramnolipidos	Singh; Tripathi, (2012)
Inibição de crescimento bacteriano em biofilmes pré-formados	Surfactina	Gomes; Nitschke, (2012)
Aplicação na indústria do petróleo	Lunasan	Luna et al. (2013)

3.1.4 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Os micro-organismos têm despertado interesses na produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais. A síntese de biossurfactantes usando óleos vegetais é uma das alternativas para reduzir os custos na produção, uma vez que a matéria-prima representa um percentual importante em processos biotecnológicos usados para produzir surfactantes naturais como alternativa aos produtos sintéticos comerciais existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Através da levedura *Candida lipolytica* foi observada a produção de bioemulsificante, utilizando-se substratos como o óleo de babaçu e glicose (SARUBBO et al., 2001). Alguns micro-organismos, como o *Paenibacillus alvei*

ARN63 (NAJAFI et al., 2011), *Candida sphaerica* (LUNA et al., 2011), *Trichosporon montevidense* (MONTEIRO et al., 2011) e *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 (SILVA et al., 2010), e fungos como *Aspergillus ustus* MSF3 (KIRAN et al., 2009) sintetizam biossurfactantes degradando substratos solúveis e insolúveis em água, os quais auxiliam na disponibilidade destes compostos à célula microbiana através das emulsões formadas entre eles.

Alguns micro-organismos degradam substratos com a finalidade de produzir metabólitos secundários. Algumas leveduras e fungos filamentosos são relatados como agentes produtores de biossurfactante, como as leveduras *Candida lipolytica* (SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006), *C. lipolytica* UCP0988 (RUFINO et al., 2008) e *C. glabrata* UCP1002 (LUNA; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2009) e os fungos filamentosos *Aspergillus ustus* MSF3, *Aspergillus fumigatus* e *Trichosporon montevidense* (KIRAN et al., 2009; CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009; MONTEIRO et al., 2011).

Muitos micro-organismos produzem surfactantes a partir de óleo residual de refinaria e resíduos agroindustriais. Dentre eles são reportados o *Bacillus subtilis* da linhagem LB5a, cultivado em manipueira; a levedura *Candida sphaerica* UCP0995, cultivada em milhocina; e o *Streptomyces* sp. DPUA1566, cultivado em milhocina na presença de óleo de soja residual de fritura (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008; SOBRINHO et al., 2008; SANTOS, 2012).

A estratégia em reutilizar subprodutos como substratos podem reduzir o custo e viabilizar a produção de tensoativos, além de servir como uma fonte de carbono adequada para garantir a obtenção de surfactantes microbianos ecologicamente seguros. Essa prática consequentemente colabora com a redução da poluição ambiental, uma vez que muitos desses dejetos são desperdiçados em lugares inapropriados (MANEERAT, 2005; RUFINO et al., 2008; LUNA et al., 2013). Na Tabela 2 foram reportadas várias espécies de micro-organismos utilizados na produção de biossurfactante na presença de diferentes fontes de carbono.

Tabela 2 – Micro-organismos utilizando diferentes fontes de carbono na produção de biossurfactante

Micro-organismo	Fonte de carbono	Referências
<i>Pseudomonas fluorescens</i> UCP1514	Oleo de motor e óleo de girassol	Lima e Silva et al. (2010)
<i>P. fluorescens</i> UCP1514	Óleo de girassol	Lima et al. (2010)
<i>P. aeruginosa</i> UCP0992	Glicerol	Silva et al. (2010)
<i>Candida lipolytica</i> UCP0988	Resíduo de óleo de soja de Refinaria	Rufino et al. (2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	Glicerol	Faria et al. (2011)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Borra de óleo de amendoim	Thavasi; Jayalakshmi; Banat, (2011)
<i>P. aeruginosa</i> LBI	Óleo de soja	Gomes; Nitschke, (2012)
<i>Pseudomona Stutzeri</i>	Óleo de oliva e soja	Singh; Tripathi, (2012)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Óleo de palma	Jara; Andrade; Campos-Takaki, (2013)
<i>Candida sphaerica</i>	Resíduo de amendoim de refinaria	Luna et al. (2013)

3.1.5 Actinomicetos

As actinobactérias são classificadas como bactérias gram-positivas, que possuem uma organização filamentosa. São originadas do solo e se caracterizam pela sua diversidade morfológica, contendo cadeias de esporos semelhantes a conídios. Destacam-se pela importância industrial por excretar metabólitos extracelulares secundários, além do papel ecológico na degradação da matéria orgânica.

São provenientes da ordem *Actinomycetales* e, de acordo com o táxon actinobacterial, são classificadas conforme a seguinte taxonomia: Domínio *bacteria*, Filo *actinobacteria*, Classe *actinobacteria*, Subclasse *actinobacteridae*, Ordem

actinomycetales, Subordem *Streptomycineae*, Família *Streptomycetaceae* e Gênero *Streptomyces* (ANDERSON; WELLINGTON, 2001).

Figura 5 - Ilustração do *Streptomyces* sp. DPUA1559 esporulando na superfície em meio agar ISP-2.



Fonte: a autora

O *Streptomyces* é um dos gêneros mais estudados, pois são os maiores produtores de antibióticos, dentre eles os aminoglicosídeos, macrolídeos, ansamacrolídeos, β -lactâmicos, peptídeos, glicopeptídeos, antraciclinas, tetraciclinas, nucleosídeos, polienos e quinonas (GARCIA-QUINTANA, 1997; RICHTER et al., 1998). Estudos moleculares sobre o genoma têm contribuído na análise filogenética de *Streptomyces* em busca de cepas mais resistentes (MOHAMMAD et al., 2010).

Conforme a literatura, vários estudos relatam a aplicação de novos primers de PCR para amplificação seletiva de 16S rDNA, formando diferente grupo de actinomicetos. Esses estudos mostram a importância das espécies de *Streptomyces* na área biotecnológica e algumas propriedades associadas ao micro-organismo, que possui a capacidade de excretar compostos ativos aplicados na medicina humana como antibióticos e anti-inflamatórios frente a diversas espécies de bactérias patogênicas (MONCIARDINI et al., 2002).

De acordo com Khopade et al. (2012b), um estudo foi realizado sobre um novo tipo de biossurfactante produzido por uma espécie de bactéria marinha *Streptomyces* sp. B3. Outra bactéria denominada como *Streptomyces tendai* TU 901/8c, sintetizou a surfactina, que é um biossurfactante do tipo hidrofóbico extracelular (RICHTER et al., 1998).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, 223, p.143–151, 2008.

ARAÚJO, L. V. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, p. 481-488, 2011.

ANDERSON A.S.; WELLINGTON E.M.H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 797-814, 2001.

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

BANAT, I.M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 427–444, 2010.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em maniveira. **Ciências e tecnologias de alimentos**, v.28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BUENO, S. M.; SILVA A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

BORDOLOI, N.K.; KONWAR, B.K.. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 495–505, 2009.

CALVO, C. et al. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Sci. Total Environ**, v. 407, p. 3634–3640, 2009.

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

CHEN, M.L. et al. Adsorption of sophorolipid biosurfactants on their own and mixed with sodium dodecyl benzene sulfonate, at the air/water interface. **Langmuir**. v. 27, p. 8854-8866, 2011.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *B. circulans*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 1675–1684, 2008.

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

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

DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes – A Handbook of Biology of Bacteria**. 3 ed., Springer: 2006. v.1

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

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

GARCIA-QUITANA.H; ZAROR C.L.; LEIVER P. S. Efeitos antibioticos de cepas solvestre de *Streptomyces* aisladas de suelos chilenos. **Revista Medica do Chile**, v. 125, p. 1157-1164,1997.

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

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

JARA, A.M; ANDRADE, R.F; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 315-318, 2013.

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

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D.A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 203-210, 2010.

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

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

LIMA, R.A. et al. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Anana comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivados do petróleo. **Exacta**, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.

LIMA e SILVA et al. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

LUNA, J. M. et al. Properties of the Biosurfactant Produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, 2011.

LUNA, J.M. et al. Caracterização, propriedades de superfície e atividade biológica de um biotensioativo produzido a partir de resíduos industriais por *Candida sphaerica* UCP0995 para aplicação em indústria de petróleo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

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

MORITA, T. et al. Isolation of *Pseudozyma hurashimaensis* sp. nov., a novel ustilaginomycetous yeast species as a producer of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.112, n.2, p. 137–144, 2011.

MONTEIRO, A.S. et al. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfacesv by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 84, p. 467–476, 2011.

MONCIARDINI, P. et al. New PCR primers for selective amplification of 16S rDNA form different group of actinomycets. **FEMS Microbiology Ecology, Amsterdam, Netherlands**, v. 142, p. 419 – 429, 2002.

MOHAMMAD, T. A. et al. Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives, Molecular. **Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 3, p. 763-772, 2010.

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

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

MUTHU et al. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 85, p. 174-181, 2011.

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

NAJAFI, A.R et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 163, p. 188–194, 2011.

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

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 633-654, 2011.

PRIYA, T.; USHARANI, G. Comparative Study for Biosurfactant Production by Using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International**. v. 2, n. 4, p. 284-287, 2009.

QIN, L. et al. Bioreactor enhanced membrane combined with submerged rhamnolipids biosurfactant: Performance for the degradation of frying oil and reduce membrane fouling. **Bioresource Technology**, v. 20, p. 126-314, 2012.

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

ROCHA, M.V.P. et al. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

RODRIGUES, L.R. et al. Biosurfactants: Potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 609-618, 2006.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.

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

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

SARAVANAKUMARI, P; MANI, K. Structural characterization of a novel xylolipidbiosurfactant from *Lactococcus lactis* analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8851-8854, 2010.

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

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

SHALIGRAM, N.S.; SINGHAL, R.S. Surfactin - A Review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 119-134, 2010.

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

SACHDEV, D.P.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.3 p.1005-1016, 2013.

SINGH, D.N; TRIPATHI, A.K. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. **Bioresour Technology**, v. 128, p. 215-221, 2012.

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

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

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

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

WINTERBURN, J.B.; RUSSELL, A.B.; MARTIN, P.J. Characterisation of HFBII biosurfactant production and foam fractionation with and without antifoaming agents. **Applied Microbiology Biotechnol.** v. 90, p. 911-920, 2011.

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

ZHAO, Z.; SELVAM, A.; WONG, J.W.C. Synergistic effect of thermophilic temperature and biosurfactant produced by *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 on the biodegradation of phenanthrene in bioslurry system, **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 345–350, 2011.

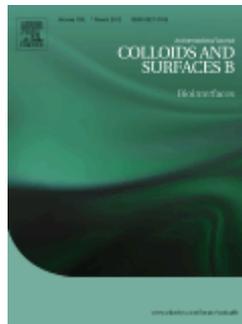
CAPÍTULO II

Produção e caracterização do biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica

Ana Paula Pereira dos Santos¹, Leonie Asfora Sarubbo² e Ana Lúcia Figueiredo Porto³

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

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



Artigo 1- a ser submetido para publicação na Revista Colloids and Surface B: Biointerfaces – Impact Factor: 2.780

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos anfifílicos que reduzem a tensão superficial e interfacial promovendo a formação de micelas e vesículas. Neste estudo foi realizada a produção e caracterização do biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica. O micro-organismo foi cultivado em meio mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona. A cinética de produção do biossurfactante foi acompanhada pela redução da tensão superficial do meio de cultivo de 60 mN/m para valores em torno de 27,14 mN/m e do índice de emulsificação, onde foi constatado a eficiência do biossurfactante como agente emulsificante frente aos composto hidrofóbicos testados. A utilização de um planejamento fatorial 2^2 foi selecionado os parâmetros como pH 8,5 e temperatura de 28°C para a produção do agente surfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559, sendo estudadas as interações desses fatores por um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os menores valores de tensão superficial ficaram em torno de 25,34 mN/m observados a partir do planejamento estatístico. O biossurfactante produzido não apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e às sementes vegetais de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.). A caracterização do biossurfactante revelou uma única banda proteica e massa molecular em torno de 14,3 kDa com caráter ácido, sugerindo a natureza glicoproteica, sendo a estrutura química composta de peptídeos. Os resultados são promissores quanto a aplicação do biossurfactante, sugerindo a possibilidade de aplicação biotecnológica e industrial da biomolécula.

Palavras-chave: Biossurfactante. Tensão superficial. *Streptomyces*. Óleo de soja residual de fritura. Biorremediação.

ABSTRACT

The biosurfactants are amphiphilic compounds which reduce the interfacial surface tension and promote the formation of micelles and vesicles. This study was a conducted production and characterization of the biosurfactant of *Streptomyces* sp. DPUA1559, isolated from lichens of the Amazon region. The micro-organism was grown on mineral medium containing 1% soybean oil and residual frying 1% peptone. The kinetics of production of the biosurfactant was accompanied by a reduction of the surface tension from the medium of 60 mN/m to values around 27,14 mN/m and the emulsification rate, in which the efficiency of the biosurfactant as an emulsifier compared to tested hydrophobic compound was found. The use of a factorial design 2^2 allowed to select the parameters as pH 8,5 and temperature of 28°C to produce the surfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1559, studying the interactions of these factors by a central composite rotational design (DCCR). The lower surface tension values were approximately 25,34 mN/m, when observed from the statistical design. The isolated biosurfactant showed no toxicity against the micro-crustacean *Artemia salina* and vegetable seeds of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and cabbage (*Brassica oleracea* L.). The characterization of the biosurfactant showed a single protein band and molecular weight around 14.3 kDa with acidic character, suggesting the glycoprotein nature, the chemical structure being composed of peptides. The results are promising for the application of biosurfactant, suggesting the possibility of industrial and biotechnological applications of biomolecule.

Keywords: Biosurfactant. Surface tension. *Streptomyces*. Residual soybean oil frying. Bioremediation.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Streptomyces* pertencem ao grupo dos Actinomicetos. Possuem organização filamentosa, são aeróbicas, apresentam catalase positiva e podem habitar em solos. São micro-organismos de interesse industrial, uma vez que a maioria das cepas sintetiza substâncias antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, antiparasitárias, herbicidas e enzimas, usadas na medicina, agricultura e processos biotecnológicos. Nos últimos anos espécies de *Streptomyces*, também, têm sido usados na produção de biossurfactantes (QUINN et al., 1994; MUTH et al., 1999; SANTOS, 2012; KHOPADE et al., 2012b).

Os biossurfactantes são moléculas anfifílicas com características tensoativas que possui uma parte hidrofóbica e hidrofílica de origem microbiana. Sua estrutura química e aplicação podem estar relacionadas de forma direta com o tipo do meio de cultivo. Uma grande variedade de moléculas já foi sintetizada a partir de outros resíduos agroindustriais como os óleos vegetais, melaço de cana-de-açúcar, manipueira, milhocina e resíduo da refinaria de soja (BARROS et al., 2008; SOBRINHO et al., 2008; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2009; RUFINO et al., 2011; LUNA et al., 2011; SANTOS, 2012).

Diversos resíduos industriais são utilizados como fonte de carbono demonstrando um potencial para produção de biossurfactante. Óleos originados de plantas apresentam composições importantes e de baixo custo para produção de moléculas tensoativas. Muitos estudos relatam o emprego de resíduo de óleo na produção dessas biomoléculas e a interação e influência das fontes de carbono e nitrogênio e seus efeitos. Diferentes fontes de carbono já foram testadas na biossíntese de biossurfactante utilizando fontes como óleo de girassol pós-fritura e óleo de soja (MUKHERJEE et al., 2006; LIMA e SILVA et al., 2010; RUFINO et al., 2011; GOMES; NITSCHKE, 2012).

O emprego de subprodutos industriais tem sido alvo de muitas pesquisas como alternativa para reduzir os custos na produção de biossurfactantes microbianos em relação aos sintéticos. Existem moléculas que apresentam propriedades específicas eficazes com potencial para atuar na interrupção de biofilmes. Outros possuem a capacidade de produzir ação antimicrobiana e antiadesiva e em outras aplicações

como na indústria de petróleo. Algumas propriedades são descritas como detergência, agentes espumantes e solubilizantes (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; BANAT et al 2010; RUFINO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2011; LUNA et al., 2013).

Os dados encontrados na literatura sobre a produção e caracterização de biossurfactantes por *Streptomyces* são escassos frente a outros micro-organismos reportados, como as leveduras *Candida glabata* UCP1002 (LUNA; SARUBBO; CAMOS-TAKAKI, 2009) e *C. lipolytica* UCP0988 (RUFINO et al., 2011) e as bactérias *Pseudomonas aeruginosas* UCP0992 (SILVA et al., 2010), *P. flourescens* UCP1514 (LIMA e SILVA et al., 2010) e *P. aeruginosa* LBI (GOMES; NITSCHKE, 2012).

Nesse sentido, considerando a importância de produtores de surfactantes de origem microbiana e a escassez de estudos por Actinomicetos, este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar um novo biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Foi utilizada uma estirpe de *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica, pertencente à Coleção do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas e cedida pela Prof.^a Dra. Maria Francisca Simas Teixeira.

2.2 Meios de esporulação e manutenção

Para preparação das condições do inóculo, os esporos foram crescidos em meio de cultivo ISP-2 sólido em placas de Petri. O meio foi constituído por: extrato de levedura 0,4% v/v, extrato de malte 1% v/v, Agar 2% v/v, para 100 ml de água destilada e incubada na estufa bacteriológica durante 15 dias à temperatura de 30°C. Após o período de esporulação, foi estocado em criotubos com glicerol 10% (v/v) e mantido em freezer a -18°C para conservação. As amostras foram repicadas a cada 30 dias para manter a ativação e pureza do micro-organismo durante todo o experimento. O micro-organismo foi ativado em meio Agar ISP-2 líquido modificado pela ausência da glicose (PRIDHAM et al., 1957). O inóculo foi constituído por extrato de levedura 0,4% v/v; extrato de malte 1,0% v/v, pH 7,0 para um volume de 100 ml do meio de cultivo distribuídos em Erlenmeyers de 250 ml esterilizados a 121°C por 20 minutos. Os esporos foram removidos da área central da placa de Petri em blocos de 6 mm de diâmetro e inoculados para ativação celular em condições de temperatura a 28°C, 150rpm em agitador orbital (B. BRAUN) durante 48 horas.

2.3 Seleção do meio de produção de acordo com um planejamento fatorial 2² para produção do biossurfactante

A cultura foi crescida em meio contendo 1% da fonte de carbono óleo residual de fritura e 1% de peptona (10 g/l), sais minerais K₂HPO₄ (4,75 g/l), NH₄Cl (1,0 g/l), MgSO₄.7H₂O (6,0 g/l) e 1ml de solução mineral (100 mg de FeSO₄.7H₂O; 100 mg de MnCl₂.4H₂O; 100 mg de ZnSO₄.H₂O; 100 mg de CaCl₂.H₂O e água destilada q.s.p 100 ml). O pH do meio de cultura foi ajustado para 7,5 com uma solução de NaOH (1M). Foi realizado um planejamento fatorial 2² para analisar a produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559, e aplicado um Delineamento

Composto Central Rotacional (DCCR), para verificar a influência dos fatores pH e a temperatura sobre a variável resposta tensão superficial. A Tabela 1 apresenta as variações dos fatores utilizados.

Tabela 1 - Valores das variáveis codificadas e reais para o DCCR adotado

Fatores\Níveis	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	8,36	8,4	8,5	8,6	8,64
Temperatura °C	26,6	27,0	28,0	29,0	29,4

pH: (X₁) ; Temperatura °C: (X₂)

2.4 Cinética de crescimento e produção do biossurfactante

Para determinação da cinética de crescimento, as amostras foram retiradas a cada 4 horas nas primeiras 12 horas, e em seguida a cada 12 horas até completar 120 horas de fermentação para determinação da biomassa, pH final, tensão superficial e índice de emulsificação.

2.5 Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada em peso seco a partir do volume de 10 ml do líquido metabólico a cada tempo da curva de crescimento até 120 horas. O líquido metabólico foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos, e o *pellet* celular foi colocado em placa de Petri e conduzido à dessecação a 105°C por 24 horas até peso constante. O resultado foi determinado em g/l de biomassa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6 Isolamento do biossurfactante produzido

Para isolar o biossurfactante produzido, o líquido metabólico livre de células foi acidificado com HCl a 6 M e pH ajustado para 2,0. O biossurfactante foi isolado utilizando o seguinte sistema clorofórmio/metanol (2:1 v/v) adicionado ao líquido metabólico em funil de separação de 500 ml. A mistura foi agitada por 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases (JAVAHERI et al.,1985). Após a separação, a fase orgânica foi removida e o procedimento executado por mais duas

vezes. O produto concentrado foi centrifugado a 3.000 x g durante 5 minutos para formação do *pellet* do biossurfactante. O *pellet* foi removido, suspenso em água Milli-q, neutralizado com solução de NaOH 1M e ajustado com pH 7,0. Em seguida a suspensão foi adicionada numa placa de Petri estéril, preservada em estufa de secagem a 37°C por 12 horas, macerada e pesada até adquirir peso constante para obter o rendimento em biossurfactante isolado em g/l.

2.7 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi determinada pelo tensiômetro Sigma 70 (KSV Instruments Ltd., Finland) utilizando o anel de DuNouy, pertencente ao Laboratório de Bioengenharia da Universidade Católica de Pernambuco. A tensão superficial da água Milli-q (72 mN/m) foi usada para calibração do tensiômetro (COOPER et al., 1987). As análises foram realizadas em triplicata a partir do líquido metabólico livre de células, em temperatura ambiente após centrifugação a 10.000 x g durante 20 minutos e filtração a vácuo.

2.8 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC foi determinada pela medida da tensão superficial da água destilada, através do tensiômetro modelo Sigma 700 (KSV Instruments Ltd., Finland) utilizando o anel DuNouy.

2.9 Índice de Emulsificação (IE₂₄)

O índice de emulsificação foi determinado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). O líquido metabólico livre de células foi misturado aos seguintes compostos hidrofóbicos: querosene, óleo de motor, óleo de motor residual, óleo diesel e os óleos vegetais de milho, canola, soja e girassol na proporção 1:1, sendo homogeneizados em Vórtex por 2 minutos e deixados em repouso em temperatura ambiente. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas e o índice de emulsificação (IE₂₄) foi calculado pela razão entre a altura da camada emulsificadora e a altura total, sendo o valor obtido multiplicado por 100.

2.10 Avaliação da estabilidade do biossurfactante frente a condições ambientais extremas de pH, temperatura e concentração de NaCl

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de

células, obtido por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos, sendo os efeitos avaliados através da tensão superficial. O líquido metabólico livre de células do biossurfactante foi submetido a condições extremas de pH (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10 e 12), temperaturas (4, 28, 40, 60, 80, 100 e 120°C) e concentrações de NaCl (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0%). As medidas de tensão superficial foram realizadas em duplicatas a temperatura ambiente (RUFINO et al., 2008).

2.11 Determinação da toxicidade do biossurfactante frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

O teste de letalidade frente à *Artemia salina* é um método importante na utilização de pesquisas com produtos naturais para avaliar o potencial tóxico de extratos e substâncias isoladas. O ensaio biológico foi realizado com o microcrustáceo *Artemia salina* utilizado como indicador prévio de toxicidade (MEYER et al., 1982). Foram incubados numa solução de sal marinho 30 g/l diluído em água destilada preparada nas condições pH 8,0 e 28°C e uma solução de água salina foi usada como controle. O experimento foi realizado em triplicata após 24 horas de incubação das larvas em tubo de ensaio contendo 10 microcrustáceos *Artemia salina* em 5 ml por tubo da solução utilizando as seguintes concentrações de 50, 100, 150, 300, 400, 500 e 600 µg/ml com base na CMC do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559, e mantidos sob luz artificial. O cálculo da taxa de mortalidade e naúplios sobreviventes dos ensaios e grupo controle foram analisados após 24 horas. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit e as concentrações letais (CL50) estimadas utilizando-se o programa POLO – PC (LEORA, 1987).

2.12 Determinação da fitotoxicidade do biossurfactante frente às sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.)

O teste de fitotoxicidade permite avaliar como as sementes poderão responder aos efeitos do princípio ativo do composto químico a ser testado. A metodologia para testar o nível de toxicidade do tensoativo isolado foi realizada de acordo com Tiquia et al. (1996) para as sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.). As sementes foram desinfetadas e em seguida colocadas em placa de Petri previamente esterilizada contendo papel de filtro e o ensaio realizado em triplicata. Em cada placa contendo 10 sementes equidistantes

foram adicionados 5 ml da solução do biotensoativo isolado nas concentrações de 1, 5 e 50 mg/ml com base numa CMC do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559.

A determinação foi expressa após 120 horas pela germinação relativa das sementes (GRS), comprimento relativo das raízes (CRR) e índice de germinação das sementes (IG), como segue:

(I) GRA (%) = número das sementes germinadas no extrato / número de sementes germinadas no controle × 100;

(II) CRR (%) = comprimento médio da raiz no extrato / comprimento médio da raiz no controle × 100;

(III) IG (%) = (GRA × CRR) / 100%

3 Caracterização do biossurfactante produzido

3.1 Composição bioquímica do biossurfactante

A composição química do biossurfactante foi determinada pelo teor de proteína por método de Lowry et al. (1951), utilizando albumina bovina para construção de curva padrão. O conteúdo de carboidrato foi determinado pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) usando a D-glucose como padrão, e o lipídio total foi determinado pelo método de Folch et al. (1957).

3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A caracterização molecular das proteínas foi realizado em gel de poliacrilamida (12%, p/v) sob condições desnaturantes na presença de lauril sulfato de sódio – SDS, e sob condição redutora na presença de 2-mercaptoetanol, segundo a metodologia de Laemmli (1970). A Eletroforese de proteínas sob condição nativa ácida foi realizada de acordo com Davis (1964). As bandas de proteínas foram submetidas à coloração com Azul de Coomassie R-250, coloração de prata e coloração de Schiff (método utilizado para identificação de glicoproteínas). Albumina de soro bovino (BSA), 66 kDa; albumina da clara do ovo, 45 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa e lisozima, 14,3 kDa, obtidas do fabricante Sigma (EUA), foram utilizadas como marcadores de peso molecular.

3.3 Espectrometria de infravermelho

Para determinação do espectro de infravermelho para análise dos principais grupos funcionais do biossurfactante isolado, a amostra foi submetida à solubilidade seriada em diferentes solventes, proporção 1:1, mg/ml, alternando a polaridade (menor polaridade → maior polaridade). Os solventes foram hexano, diclorometano, metanol, acetato de etila e água destilada. A amostra foi analisada pelo método ATr em espectrometria de infravermelho, transformada de Fourier (FT-IR). A análise do espectro foi gerada no intervalo de comprimento de ondas de 4-4000 cm^{-1} utilizando o equipamento Varian 640 IR.

3.4 Teste de dispersão e agregação de óleo

De acordo com Morikama et al. (1993) o teste é realizado para verificar a dispersão e agregação do óleo. O teste foi modificado pelo tipo e volume de óleo utilizado. Foi utilizada uma placa de Petri previamente esterilizada com 100 ml de água Milli-q. e 10 μl do óleo de motor e 15 μl do líquido metabólico do biossurfactante bruto produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559. A visualização do ensaio pôde ser evidenciada após 30 segundos.

3.5 Análises estatísticas dos resultados

3.5.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) como ferramenta estatística para produção de bioprocessos

Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 para analisar a produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559, e aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) como ferramenta estatística de bioprocessos para verificar a influência dos fatores pH e a temperatura sobre a variável resposta tensão superficial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultado do planejamento experimental e DCCR

Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 na produção do biossurfactante por

Streptomyces sp. DPUA1559. As variáveis independentes ou fatores usados foram o pH e a temperatura (°C), para aplicação de um DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). As duas características mais desejáveis em um projeto experimental do tipo DCCR são Ortogonalidade e Rotabilidade. A Ortogonalidade garante o efeito e interação das estimativas de interesse sejam independentes umas das outras (ATIKISON; DONEV, 1992).

Em outras palavras, quanto mais ortogonal a concepção é, mais informações independentes podem ser extraídas a partir dos resultados sobre os efeitos. Por outro lado, a forma de Rotabilidade permite que se extraia o máximo de informações. Ortogonalidade e Rotabilidade dependem do número de pontos no centro, da concepção e da chamada distância axial α , que é a distância máxima da estrela de pontos a partir do centro do modelo. Portanto, planejamentos do tipo DCCR, em que o R indica Rotabilidade (Rotacional), são também fortemente recomendados.

Multiplicar o ponto central em um DCCR é fortemente recomendado. Os pontos centrais melhoram as estimativas dos efeitos quadráticos e possibilitam graus de liberdade adicionais para o erro. Além disso, os pontos centrais permitem informação extra quanto à região experimental, onde os melhores valores-resposta estão localizados (MATEUS, 2001).

A escolha de um planejamento fatorial adequado é função direta do número de fatores a serem estudados, da disponibilidade de matéria-prima, do número de ensaios que têm viabilidade de serem realizados e do custo desses ensaios (MONTGOMERY, 1991). Contudo, existe um número mínimo de experimentos a serem realizados para que a discussão dos resultados e a interpretação estatística não fiquem comprometidas. No caso de 2 ou 3 variáveis independentes, recomenda-se um DCCR.

Para 4 fatores pode-se fazer opção por um DCCR ou inicialmente um planejamento fracionário do tipo 2^{4-1} , como uma investigação inicial em relação aos efeitos das variáveis independentes estudadas sobre as respostas desejadas. Cinco fatores resultam em um número elevado de ensaios (2^5 fatoriais completos + 10 pontos axiais + 3 repetições no ponto central). Neste caso, o processo ainda está longe das condições otimizadas, não compensando investir diretamente num planejamento fatorial completo (MONTGOMERY, 1991).

A matriz do planejamento obtida para o DCCR é apresentada pela Tabela 2. Nesta Tabela também são apresentados os valores da variável resposta de tensão superficial (mN/m).

Tabela 2 – Resultado do planejamento e DCCR aos dados experimentais propostos para produção do biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação

Exp.	pH	Temperatura °C	Tensão Superficial (mN/m)
		X ₂	
1	8,40	27,0	30,40
2	8,40	29,0	28,00
3	8,60	27,0	29,38
4	8,60	29,0	27,47
5	8,36	28,0	30,73
6	8,64	28,0	28,85
7	8,50	26,6	28,68
8	8,50	29,4	26,95
9	8,50	28,0	25,47
10	8,50	28,0	25,96
11	8,50	28,0	25,59
12	8,50	28,0	24,34

pH: (X₁) ; Temperatura °C: (X₂); Tensão superficial - mN/m: (Y)

Nessa tabela pode-se observar que os valores de tensão superficial passam por um mínimo no ponto central dando indicação de que o intervalo de estudo foi adequado, quando a redução de tensão superficial foi utilizada como um critério primário para seleção da fonte de carbono para produção do biossurfactante.

Um Delineamento Composto Central Rotacional foi utilizado para determinar as condições da produção do agente surfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559 com o auxílio da Análise de Variância - ANOVA (Tabela 3), e os parâmetros como erro experimental, falta de ajuste, constante de Fisher (F) e valor do nível de confiança (p) servem de critérios para obtenção de um modelo estatístico de previsão.

Tabela 3 – Análise de Variância para a tensão superficial do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação

FATOR	Graus		Média	F	P
	Soma Quadrática	de Liberdade			
X ₁	2,22539	1	2,22539	4,59995	0,121308
X ₁ *X ₁	31,74989	1	31,74989	65,62788	0,003931
X ₂	5,67020	1	5,67020	11,72046	0,041735
X ₂ *X ₂	9,85354	1	9,85354	20,36753	0,020332
X ₁ *X ₂	0,05978	1	0,05978	0,12357	0,748437
Falta de ajuste	0,58603	3	0,19534	0,40378	0,762023
Erro experimental	1,45136	3	0,48379		
TOTAL	45,95987	11			

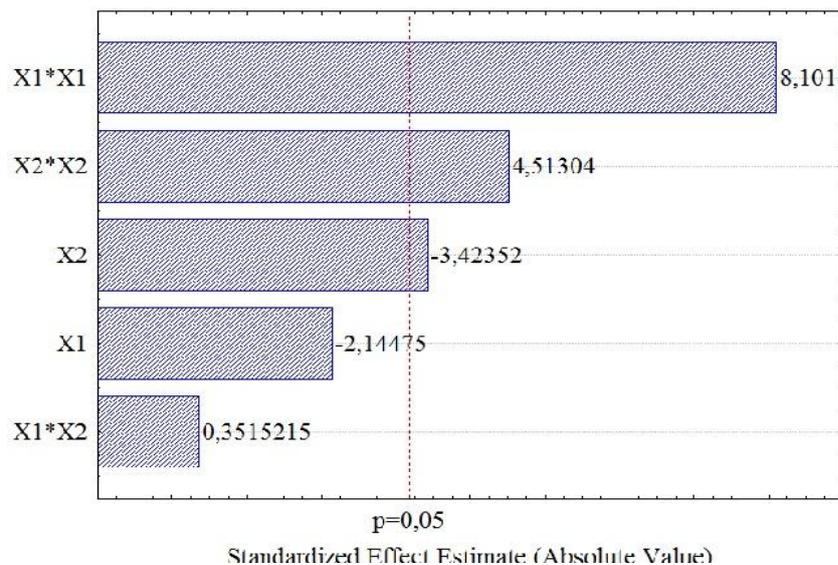
X₁ = pH; X₁*X₁ = quadráticos do pH; X₂ = temperatura °C; X₂*X₂ = quadráticos da temperatura; X₁*X₂ = quadráticos do pH e temperatura °C; R² = 0,9557; R = 0,9187; F_{crítico} = 10,12 (X₁²)

A análise da tabela de ANOVA na Tabela 3 indica que os termos lineares da temperatura (X₂) e quadráticos da temperatura (X₂²) e do pH (X₁²) são estatisticamente significativos, uma vez que o valor crítico da constante de Fisher, para esses termos, é menor que os respectivos valores calculados. Isso também pode ser visto através dos respectivos valores do nível de confiança (p), cujo valor nesses casos encontra-se abaixo de 0,05. Afirmações opostas podem ser ditas para os termos linear de pH e de interação entre pH e temperatura, os quais não têm

significâncias estatísticas para o modelo de previsão. Por outro lado, a inexistência de falta de ajuste e o valor relativamente pequeno para o erro experimental asseguram que se obteve um bom modelo de previsão.

A Figura 1 apresenta um diagrama de Pareto dos experimentos, o qual reforça o que foi observado através dos valores da tabela de ANOVA. Observa-se ainda nesse diagrama que o termo estatisticamente mais significativo é o termo quadrático de pH, seguido em ordem decrescente pelo termo quadrático de temperatura e linear de temperatura.

Figura 1 – Diagrama de Pareto mostrando os efeitos individuais e combinados de pH (X_1) e temperatura (X_2) e quadráticos da temperatura (X_2^2) e do pH (X_1^2) sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação



$X_1^2 * X_1$ = quadráticos do pH; $X_2^2 * X_2$ = quadráticos da temperatura; X_2 = temperatura $^{\circ}$ C; X_1 = pH

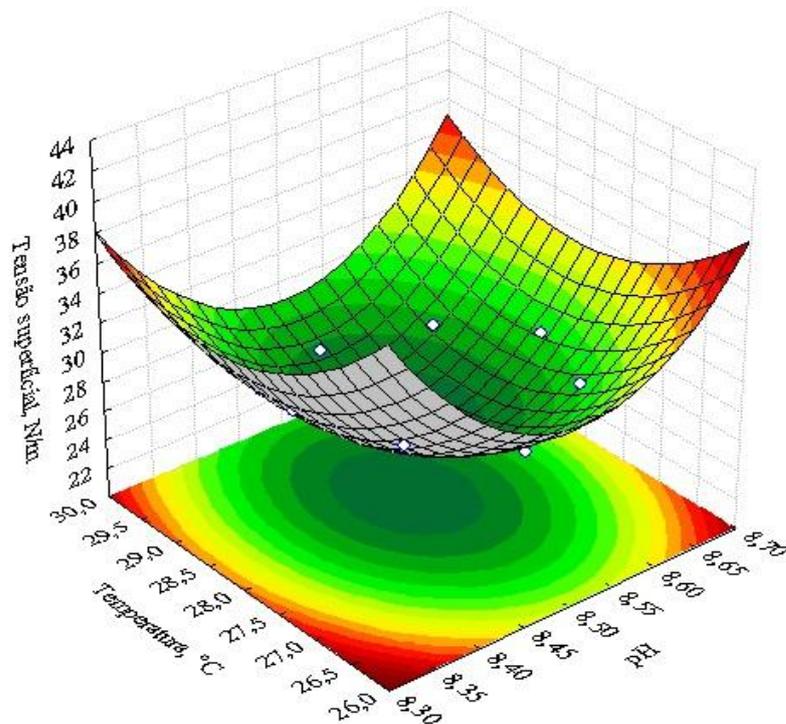
$X_1^2 * X_2$ = quadráticos do pH e temperatura $^{\circ}$ C

Desta forma, apenas os valores utilizados individual foram eficazes na redução da tensão superficial. Seguindo essas análises numéricas e gráfica chega-se a um modelo estatístico de previsão para o intervalo de operação abrangido pelos valores limites utilizado no DCCR. Têm-se, portanto para previsão da tensão superficial, um modelo baseado nos coeficientes de regressão obtidos com auxílio da Tabela 1 do Apêndice (Equação 1):

$$Y = 17450 - 3826 \cdot X_1 + 223 \cdot X_1^2 + 1,24 \cdot X_2^2 \quad (1)$$

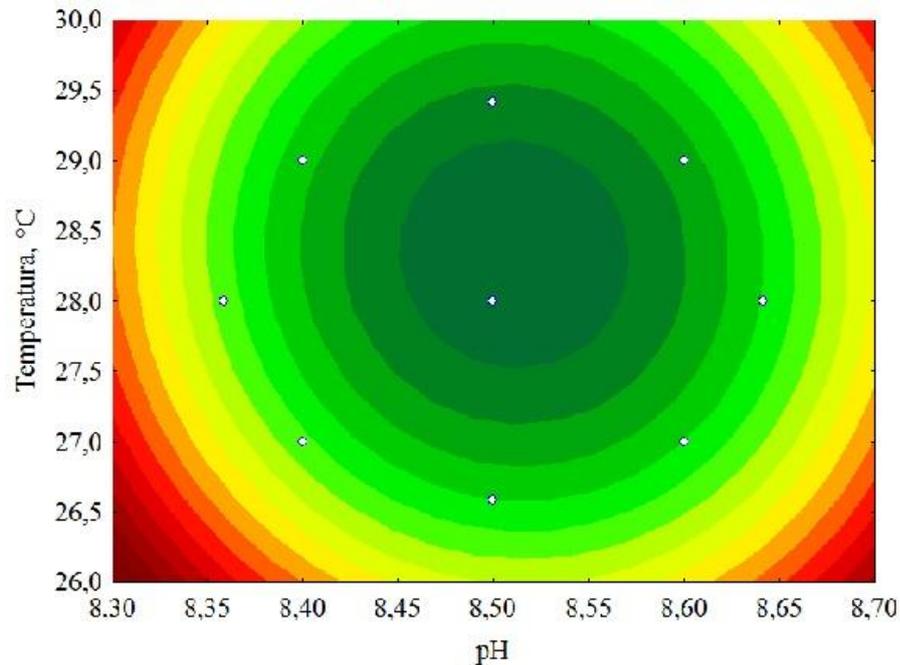
A partir do modelo da Equação 1 chegou-se ao gráfico de superfície de resposta mostrado pela representação da Figura 2 a seguir. Nesta Figura 2, pode-se observar a ocorrência de um valor mínimo próximo do intervalo de condições operacionais escolhidas. A tensão superficial dentro desse intervalo atinge o melhor valor para as substâncias tensoativas produzidas.

Figura 2 – Superfície de resposta apresenta os efeitos do pH e da temperatura sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação



A Figura 3, a seguir, ilustra a existência de pouca interação entre os dois fatores escolhidos na obtenção do biossurfactante. Essa figura mostra uma projeção da superfície de resposta da Figura 2, obtendo-se com isso curvas de considerável paralelismo. Esse comportamento indica que se pode fazer previsões sobre a tensão superficial do biossurfactante com base em apenas nas variações de uma das duas variáveis.

Figura 3 – Curvas de nível associadas aos efeitos de pH e temperatura sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação



Os resultados obtidos foram consideráveis, uma vez, que o *Streptomyces* sp. DPUA1559 foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de cultivo na presença da fonte de carbono, atuando na redução da tensão superficial em todos os ensaios.

Considerando os resultados de tensão superficial na matriz do planejamento fatorial (Tabela 2), a melhor condição foi pH 8,5 e temperatura 28°C, determinada a partir do ponto central, apresentando valores médios de tensão superficial em torno de 25,34 mN/m e rendimento em torno de 1,17 g/l. Os valores de tensão superficial obtidos neste trabalho foram inferiores aos reportados por Mulligan (2005), que observou uma redução da tensão superficial para valores de 27 mN/m produzido por *Bacillus subtilis* e por Lima e Silva et al. (2010), apresentando uma tensão superficial para valores de 31,68 e 33,72 mN/m por *Pseudomonas fluoresces* UCP1514. Corroboram com estes resultados os dados de Santos (2012) e Rufino et al. (2011) para valores de 24,72 mN/m por *Streptomyces* sp. DPUA1566 produzindo um lipopeptídeo e de 25 mN/m por *Candida lipolytica* UCP0988 produtora do Rufisan.

O óleo de soja residual de fritura foi selecionado como fonte de carbono para experimentos posteriores, onde a reutilização deste resíduo pode contribuir para minimizar o impacto ambiental e diminuir os custos de produção de novos biossurfactantes. Vários pesquisadores utilizaram diferentes subprodutos

agroindustriais na produção de biossurfactantes como milhocina, glicerol, resíduo de óleo de soja de refinaria, óleo de soja, óleo de soja residual de fritura e resíduo de amendoim de refinaria (SOBRINHO et al., 2008; SILVA et al., 2010; RUFINO et al., 2011; GOMES; NITSCHKE, 2012; SINGH; TRIPATHI, 2012; SANTOS, 2012; LUNA et al., 2013).

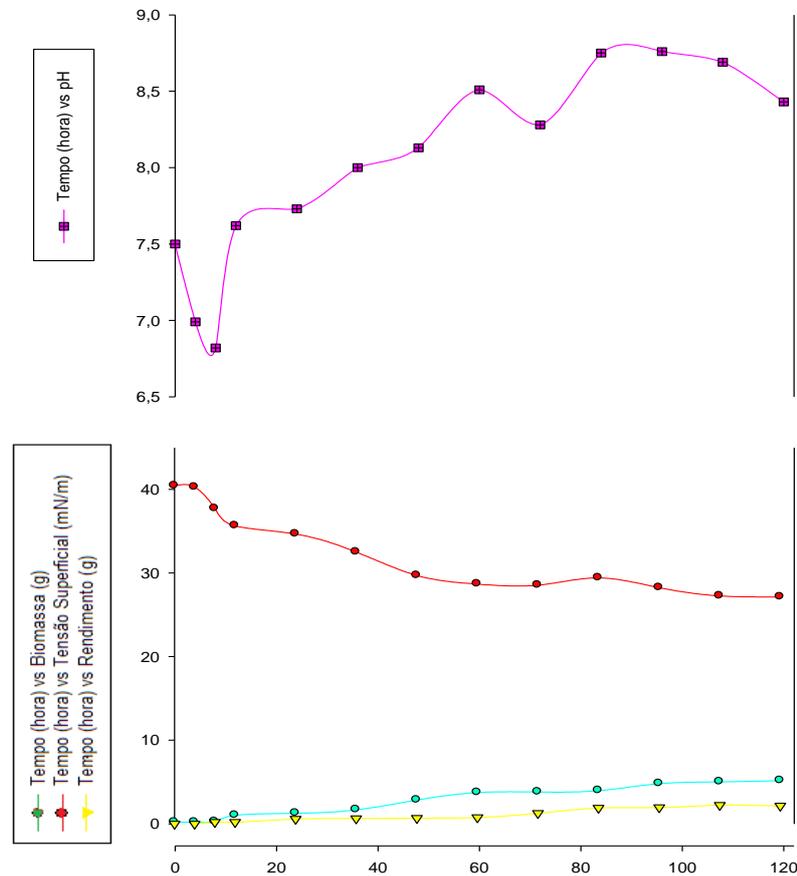
A maioria dos dados reportados na literatura é de bactérias encontradas em solos ou ainda isoladas de ambientes hostis como a *Pseudomonas aeruginosa*, classificada como uma bactéria gram-negativa e baciliforme e que ao longo dos anos vem se destacando como potenciais produtores de biossurfactantes (LIMA E SILVA et al., 2010; GOMES; NITSCHKE, 2012).

4.2 Cinética de crescimento e produção de biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1559

A Figura 4 representa a cinética de crescimento e produção do biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio mineral contendo óleo de soja residual de fritura a 1% e peptona a 1% durante 120 horas de cultivo. Nas 24 horas foi observado o início da fase exponencial do micro-organismo, aonde a fase de adaptação às composições físico-químicas do meio de cultivo apresentou uma biomassa em torno de 1,26 g/l e após 48 horas de cultivo iniciou-se a fase estacionária de crescimento e produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559.

Com 96 horas em fase estacionária, a biomassa apresentou um valor em torno de 4,81 g/l e a sua máxima produção alcançou em torno de 5,02 g/l após 108 horas de fermentação, acompanhada pela redução da tensão superficial indicando propriedades tensoativa do biossurfactante. Rufino et al. (2008) reportam que cada micro-organismo se adapta a um valor específico de pH para cada tipo de biossurfactante a ser produzido e que a levedura *Candida lipolytica* UCP0988 iniciou a fase de crescimento após 48 horas de cultivo.

Figura 4 – Cinética de crescimento, pH, tensão superficial e produção do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 120 horas de fermentação



O pH final do meio fermentado na fase de latência sofreu alterações nas primeiras 24 horas, entre pH 6,8 e 7,7, permanecendo depois inalterado durante a fase do experimento, em torno de 8,0 e 8,7, indicando que, após o tempo que se segue à inoculação do meio de cultivo, o micro-organismo se adapta ao novo substrato e promove a biossíntese de compostos essenciais ao crescimento, produzindo efeito positivo na redução da tensão superficial e estabilidade do biossurfactante (ABOUSEOUR et al., 2008; LIMA et al., 2010).

A redução da tensão superficial ocorreu logo após 48 horas para valores inferiores a 30 mN/m, e a tensão do meio de cultivo foi reduzida de 60 mN/m para 27 mN/m ao final das 120 horas, enquanto foi reportado por Santos (2012) que a redução da tensão superficial alcançou valores inferiores a 30 mN/m após 72 horas na produção de biossurfactantes por *Streptomyces* sp. DPUA1566.

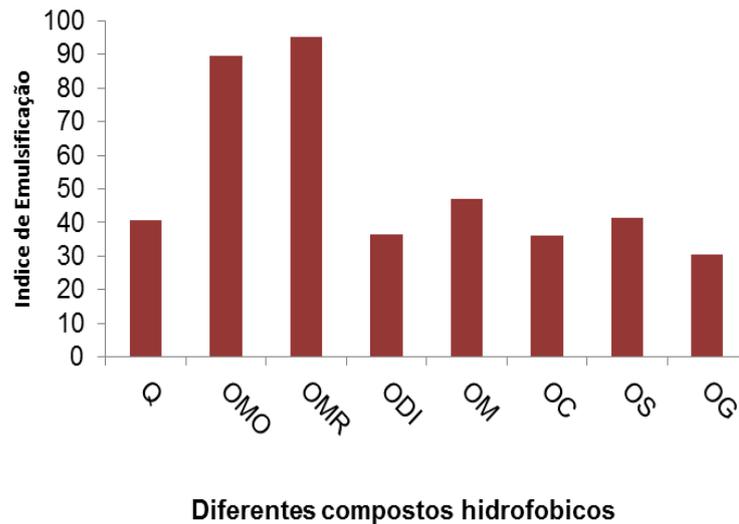
Valores similares foram reportados por Lima et al. (2010) em torno de 27,5 mN/m, enquanto Silva (2009) reportou um valor de tensão superficial superior a 30,04 mN/m por uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens*. Lima e Silva (2010) também reporta uma tensão superficial em torno de 31,68 mN/m e 33,72 mN/m por *P. fluorescens* UCP1514. Foi reportado por Rufino et al. (2008) um valor inferior de tensão superficial no meio de cultivo de 50 mN/m para 25,29 mN/m por *Candida lipolytica* UCP0988.

A produção de biossurfactante por *Streptomyces* sp. DPUA1559 foi observada na fase estacionária após 96 horas, apresentando um valor de rendimento em torno de 1,95 g/l, e a sua máxima produção foi de 2,24 g/l após 108 horas de cultivo. Santos (2012) reporta que a produção de biossurfactantes por *Streptomyces* sp. DPUA1566 ocorreu na fase estacionária após 96 horas de cultivo, obtendo um rendimento de 1,7 g/l, sendo estável até 144 horas de cultivo. Também foi reportada por Lima e Silva et al. (2010) a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas fluorescens* UCP1514 na fase estacionária, após 72 horas de cultivo em meio alternativo com caldo de abacaxi suplementado a óleo de girassol pós-fritura.

4.3 Determinação do índice de emulsificação em diferentes compostos hidrofóbicos

O índice de emulsificação foi determinado utilizando o líquido metabólico livre de células para diferentes substratos hidrofóbicos: querosene, óleo de motor, óleo de motor residual, óleo diesel e óleos vegetais de milho, canola, soja e girassol ilustrados na Figura 5. Conforme a análise dos resultados obtidos, foi demonstrado que o líquido metabólico apresentou emulsificação de 40% para querosene, enquanto para os óleos de motor e motor residual as taxas de emulsificação foram respectivamente 89 e 95%, enquanto o óleo diesel não foi efetivamente emulsificado.

Figura 5 – Índice de emulsificação em líquido metabólico do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a diferentes compostos hidrofóbicos como querosene (Q), óleos de motor (OMO), óleo de motor residual (OMR), diesel (ODI), óleo de milho (OMI), óleo de canola (OCA), óleo de soja (OSO) e óleo de girassol (OGI)



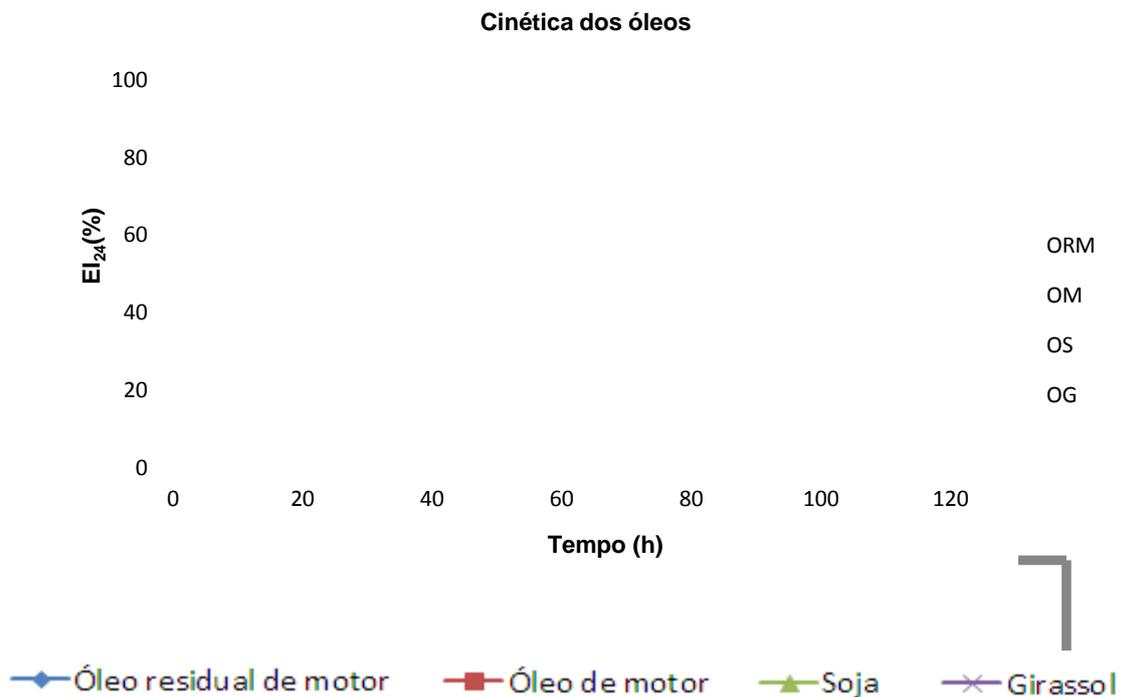
A camada de emulsão formada nos óleos vegetais apresentou 47%, para óleo de milho, 36% para óleo de canola, 41% para óleo de soja e 30% em óleo de girassol. Os valores do índice de emulsificação frente aos óleos vegetais contendo os biossurfactantes produzidos por *Streptomyces* sp. DPUA1559 foram similares aos achados por Santos (2012). Rufino et al. (2008) obteve um resultado inferior testando óleo de motor em torno de 78% e para óleo de milho obteve valor superior de 70% em líquido metabólico produzido por *Candida lipolytica* UCP0988. Valores superiores foram descritos por Santos (2012) para os óleos de motor e motor residual: ambos apresentaram 100% de emulsão.

Alguns pesquisadores reportam que a atividade emulsificante depende da afinidade do biossurfactante com o substrato testado (THANOMSUB et al., 2004; URUM; PEKDEMIR, 2004; RUFINO et al., 2008). Portanto, considerando os resultados obtidos, o biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 nas condições estabelecidas neste estudo demonstrou afinidade frente aos compostos hidrofóbicos testados, podendo atuar como agente surfactante e agente emulsificante.

4.4 Cinética do índice de emulsificação do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 após 120 horas de cultivo

A Figura 6 mostra a cinética do índice de emulsificação a partir dos substratos ilustrados no item anterior, que demonstraram melhor afinidade na emulsificação durante 120 horas de cultivo frente aos compostos hidrofóbicos óleo residual de motor, óleo de motor, óleo de soja e óleo de girassol. O índice de emulsificação é um excelente avaliador da emulsão formada durante a cinética do biossurfactante, frente a diferentes compostos hidrofóbicos, cuja combinação entre dois líquidos imiscíveis resultam na formação de emulsões (RUFINO et al., 2008).

Figura 6 – Cinética do índice de emulsificação no líquido metabólico livre de células do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 120 horas de fermentação frente aos compostos hidrofóbicos óleo de motor residual, óleo de motor, óleo vegetal de soja e óleo vegetal de girassol



Após 24 horas, os valores dos índices de emulsificação demonstraram-se crescentes, tornando-se estáveis após 120 horas de cultivo. Altos valores de emulsão foram obtidos para o óleo de motor residual e óleo de motor, ambos com 100% de emulsificação, enquanto que os óleos vegetais de soja e girassol emulsionaram em torno de 80 e 70% respectivamente.

Resultados similares foram descritos utilizando líquidos metabólicos produzidos por dois tipos de micro-organismos: o *Streptomyces* sp. DPUA1566 com óleo de motor e óleo de motor residual e a levedura *Candida lipolytica* UCP0998 com óleo de motor. Enquanto isso o valor inferior de emulsificação foi obtido utilizando-se o biossurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens* UCP1514 com óleo de girassol (LIMA e SILVA et al., 2010). Desta forma, a estirpe de *Streptomyces* sp. DPUA1559 apresentou uma excelente atividade de emulsão assimilada pelo biossurfactante, mostrando afinidade e solubilidade frente aos componentes hidrofóbicos testado e indicando aplicabilidade como agente surfactante, além de poder atuar também como agente emulsificante (RUFINO et al., 2008).

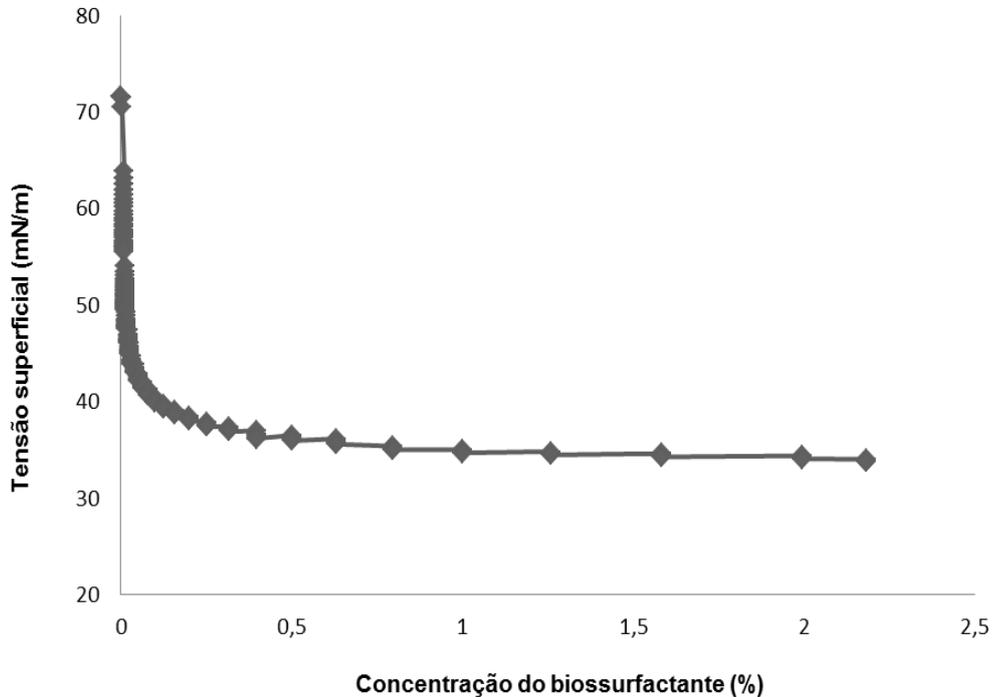
4.5 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica é definida como a menor concentração capaz de reduzir ao máximo a tensão superficial do meio formando micro-emulsões na interface, indicando a atividade surfactante das moléculas. As moléculas anfifílicas são caracterizadas por apresentarem estruturas hidrofílicas e hidrofóbicas, que se associam de forma espontânea em solução aquosa a partir da concentração micelar crítica (MORAES; REZENDE, 2004; MULLIGAN, 2005; SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006; RUFINO et al., 2008).

A Figura 7 representa a CMC do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559, que demonstrou um potencial em reduzir a tensão superficial de 70 mN/m para 33,76 mN/m, correspondendo a uma CMC de 10 mg/ml. Resultados semelhantes foram reportados por Rufino et al. (2008), por um biossurfactante produzido pela levedura *Candida lipolytica* UCP0998, apresentando um valor de CMC similar de 10 mg/ml e uma tensão superficial em torno de 32 mN/m.

Resultados superiores de CMC foram reportados para *Streptomyces tendae* de 36 mg/l e *Streptomyces* sp. B3 de 110 mg/l (RICHTER et al., 1998; KHOPADE et al., 2012a). Gudina et al. (2010) reporta uma CMC de 2,5 mg/ml e tensão superficial de um biossurfactante produzido por *Lactobacillus paracasei*.

Figura 7 – Valores de tensão superficial e concentração micelar crítica do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação



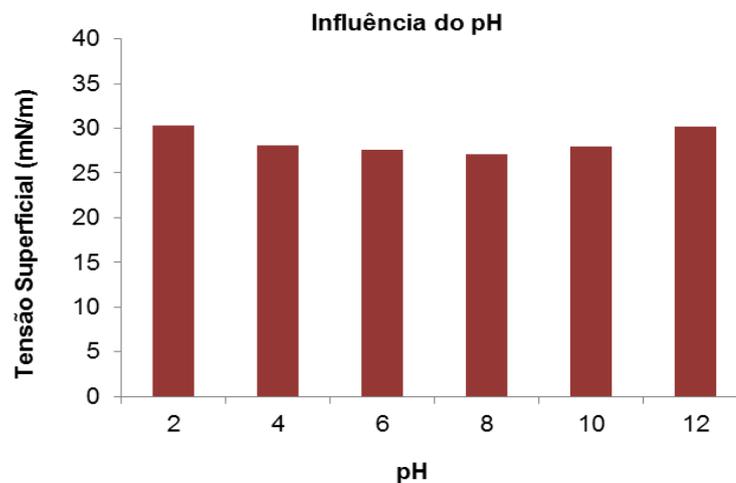
Um valor inferior de tensão superficial de 70,3 mN/m para 25,42 mN/m foi reportado por Yu-Chi Chen (2012), por *Bacillus licheniformis* TKU004 na produção de biossurfactante numa concentração de 350 mg/l. Valores inferiores de CMC foram reportados pela levedura *Candida sphaerica* UCP0995 e por *Streptomyces* sp. DPUA1566, apresentando uma concentração em torno de 0.08% (SOBRINHO et al., 2008; SANTOS, 2012).

4.6 Avaliação da estabilidade do biossurfactante frente a condições ambientais extremas de pH, temperatura, concentração de NaCl

A estabilidade do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 foi avaliada através da tensão superficial, como um indicador importante na avaliação do biossurfactante frente a condições ambientais extremas. A Figura 8 apresenta a influência do pH na tensão superficial do líquido metabólico livre de

células, produzido a partir dos substratos óleo de soja residual de fritura e peptona após 96 horas de fermentação.

Figura 8 – Influência do pH na estabilidade do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 no líquido metabólico em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a valores de tensão superficial em líquido metabólico produzido por *Streptomyces* sp DPUA1559 após 96 horas de fermentação

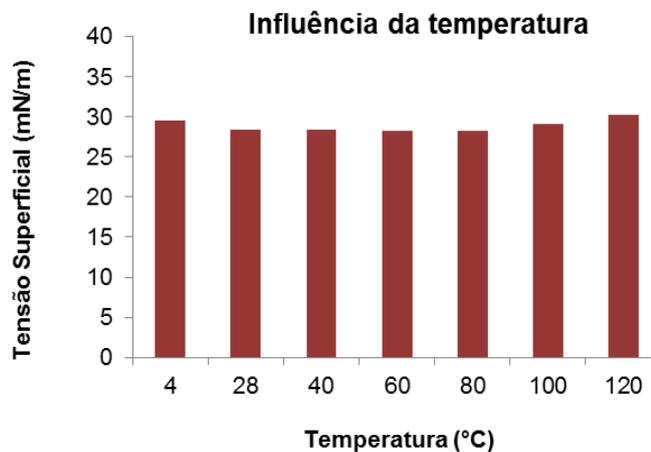


Os resultados obtidos mostraram que o biossurfactante não apresentou alterações significativas nos valores de tensão superficial quando submetido a diferentes valores de pH (4, 6, 8, 10), e com discreta alteração nas faixas entre 2-12, se manteve estável com valores de tensão superficial em torno de 30,20 mN/m. Isto indica que com a desnaturação de componentes protéicos ou o aumento da ionização do meio pode ocasionar a variação da tensão superficial em valores de pH extremos (GHURYE et al., 1994).

Santos (2012) reporta um biossurfactante produzido pelo *Streptomyces* sp. DPUA1566, apresentando estabilidade similar entre as faixas de pH 6-8. O biossurfactante Rufisan, produzido por *Candida lipolytica* UCP0988, apresentou estabilidade similar frente às condições ambientais de pH, avaliado pela tensão superficial do líquido metabólico obtido em condições otimizadas, apenas variando a tensão superficial na faixa de pH 12 (RUFINO et al., 2008). Enquanto que a levedura *Candida sphaerica* UCP0995, reportada por Sobrinho et al. (2008), apresentou estabilidade entre a faixa de pH 2-12 com valores de tensão superficial inferior em torno de 26 mN/m.

A Figura 9 ilustra a influência de diferentes valores de temperatura frente à tensão superficial no líquido metabólico. O biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp DPUA1559 mostrou resistência diante das altas ou baixas temperaturas submetidas, apresentando estabilidade térmica aos valores de tensão superficial.

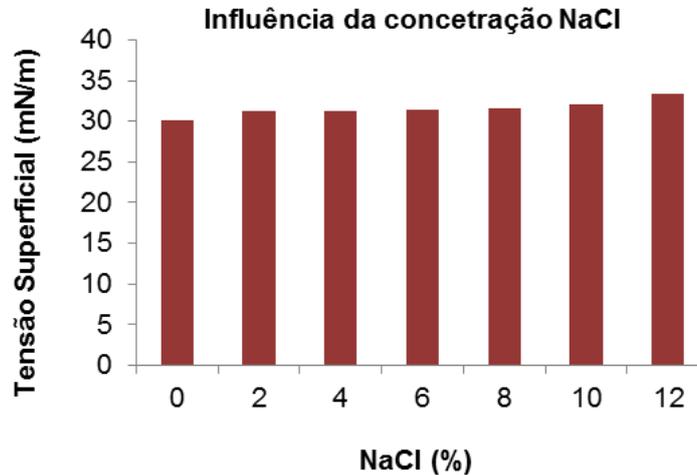
Figura 9 – Influência da temperatura na estabilidade do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 no líquido metabólico em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a valores de tensão superficial em líquido metabólico produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 após 96 horas de fermentação



De acordo com a tensão superficial, as faixas de temperaturas entre 4-80, se mantiveram decrescentes, demonstrando estabilidade do biossurfactante, com discreta alteração em valores extremos na faixa de temperaturas entre 100-120. Foi reportado na literatura um tipo de biossurfactante produzido por uma bactéria não identificada, o qual reduziu a tensão superficial do líquido metabólico livre de células quando submetido a temperaturas entre 0°C e 4°C, e também quando foi exposto a temperaturas elevadas entre 100-120 com valores de tensão superficial estáveis em torno de 30,5 mN/m a 31,8 mN/m (BROWN et al., 1985).

Os valores de tensão superficial frente à temperatura reportados neste estudo são próximos aos descritos por Khopade et al. (2012b) e Santos (2012), obtidos pelos respectivos biossurfactantes produzidos por *Streptomyces* sp. B3 e por *Streptomyces* sp. DPUA1566. A Figura 10 ilustra a influência da concentração de sal na estabilidade do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559.

Figura 10 – Influência da concentração de NaCl na estabilidade do biossurfactante produzido de *Streptomyces* sp. DPUA1559 no líquido metabólico em meio de cultivo mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação frente a valores de tensão superficial em líquido metabólico produzido por *Streptomyces* sp DPUA1559 após 96 horas de fermentação



O biossurfactante produzido apresentou estabilidade aos valores de tensão superficial quando submetido às altas concentrações de NaCl. Os resultados obtidos estão dentro dos parâmetros, considerando que concentrações acima de 2% de NaCl são suficientes para inibir a atuação de surfactantes sintéticos. De acordo com a concentração de sal utilizada, os valores de tensão superficial podem ser alterados a partir da concentração de NaCl de 2% (KIM et al., 2000).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* produziu um biossurfactante que apresentou estabilidade frente à força iônica, utilizando a concentração a partir da concentração de 2% de NaCl. Os surfactantes microbianos sintetizados por *Candida lipolytica* UCP0988 e *C. sphaerica* UCP0995 também foram estáveis nas diferentes concentrações de NaCl, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho (PIETRO et al., 2008; RUFINO et al., 2008; LUNA et al., 2013).

4.7 Determinação da toxicidade do biossurfactante frente ao micro-crustáceo *Artemia salina*

O ensaio biológico foi realizado frente ao microcrustáceo *Artemia salina* como avaliação prévia da toxicidade do biossurfactante produzido. A metodologia foi realizada de acordo com Meyer et al. (1982) para avaliação de metabolitos secundários de compostos, e a concentração letal média e de (CL50) em µg/ml. Os

resultados indicam que o biotensoativo produzido pelo *Streptomyces* sp. DPUA1559 não apresentou toxicidade nas concentrações de 50, 100 e 150 µg/ml com base numa CMC de 10 mg/ml, apresentada pelo biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559.

A concentração foi letal a partir de 300 µg/ml, apresentando um intervalo de 95% de confiabilidade com 40% de mortalidade, a partir da 294,4 já indicando baixa toxicidade na presença do biotensoativo produzido, apresentando indicativo para aplicação nas indústrias de petróleo e derivados, sendo que a concentração de 600 µg/ml foi a que promoveu 100% de mortalidade.

De acordo com Saeki et al. (2009), um biotensoativo JE1058BS produzido por *Gordonia* sp. também demonstrou baixa toxicidade frente a duas espécies de larvas marinhas, *Bahia mysidopsis* (camarão) e *Menidia beryllina* (peixe). Os biotensoativos produzidos por *Streptomyces* sp. DPUA1566 (SANTOS, 2012) e pela levedura *Candida sphaerica* UCP0995 (LUNA et al., 2013) não apresentaram toxicidade frente ao micro-crustáceo *Artemia salina*. Contudo as concentrações testadas foram inferiores as utilizadas neste trabalho.

4.8 Determinação da fitotoxicidade do biossurfactante frente às sementes vegetais de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.)

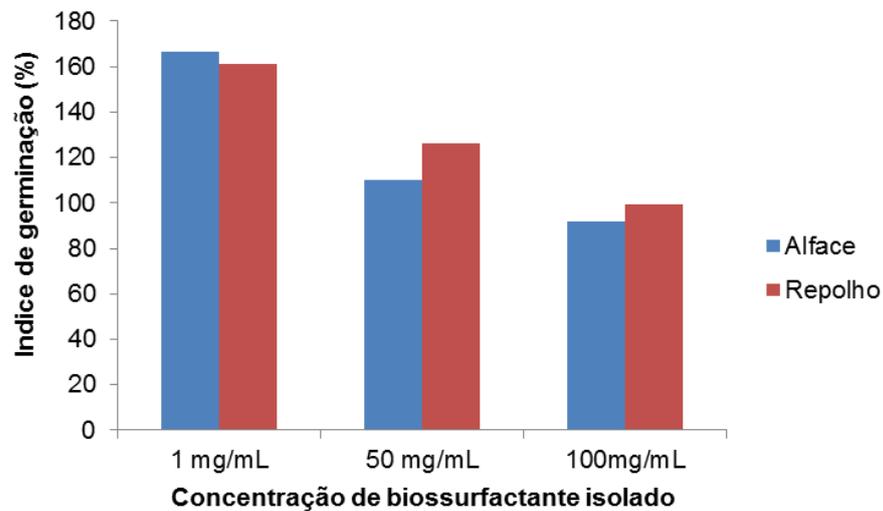
Os índices de germinação das sementes e alongamento das raízes dos respectivos vegetais alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.) foram utilizados para avaliar a fitotoxicidade do biotensoativo produzido. Um valor de índice de germinação de 80% tem sido utilizado como um indicador da ausência de fitotoxicidade (TIQUIA et al., 1996).

A Figura 11, apresentada a seguir, mostra que as concentrações testadas a partir de 1, 5 e 50 mg/ml com base numa CMC de 10 mg/ml, apresentada pelo biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559, não tiveram efeito inibitório sobre a germinação das sementes ou alongamento de raízes após 5 dias de incubação.

Os resultados obtidos para alface foram de 167, 110 e 92%, e para repolho foram de 162, 126 e 100%, apresentando alta germinação, com boa correlação entre alongamento médio das raízes e índice de germinação. Nos biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 e *Streptomyces* sp. DPUA1566,

foi verificada a ausência de toxicidade frente às sementes vegetais de *Lactuca sativa* L. e *Brassica oleracea* L. em concentrações similares aos reportados neste trabalho, assim como no biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP0995 utilizando-se concentrações inferiores (SILVA et al., 2010; SANTOS, 2012; LUNA et al., 2013).

Figura 11 – Ilustração da fitotoxicidade em líquido metabólico do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às sementes vegetais de alface (*Lactuca sativa* L.), repolho (*Brassica oleracea* L.)



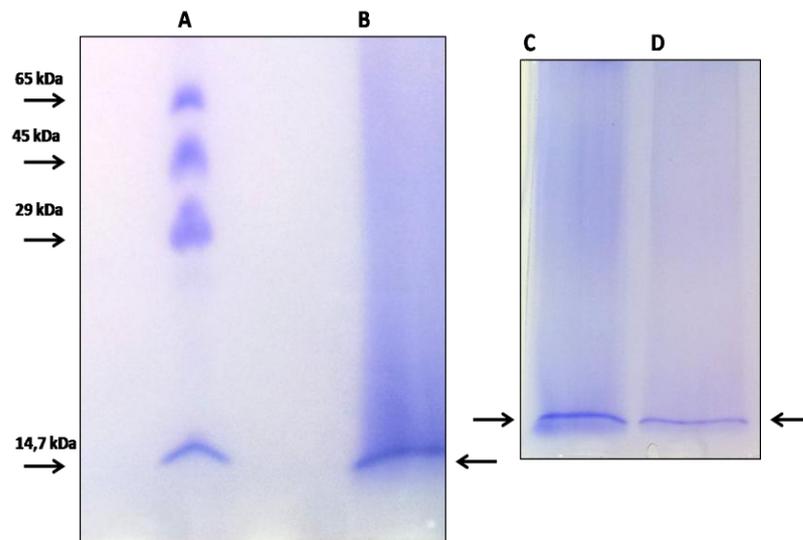
5 Caracterização do biossurfactante de *Streptomyces* sp. DPUA1559

A análise do biotensoativo isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 consistiu em sua composição química 20,0% de proteína, 38,0% de carboidratos e 12,0% de lipídio total. A porção proteica, que foi submetida à coloração de Schiff, demonstrou-se positiva, dando um indicativo de glicoproteína.

Estes resultados são similares aos reportados por Rufino et al. (2008), do biossurfactante isolado de *Candida lipolytica* UCP0988, que apresentou 50,0% de proteínas, 8,0% de carboidratos e 20,0% de lipídios na presença de óleo de soja de refinaria. Outros resultados foram reportados por Thavasi et al. (2011), de um biossurfactante por *Lactobacillus delbrueckii* apresentando em sua composição 30,0% de carboidratos e 70,0% de lipídio, e por Luna et al. (2013), de um biossurfactante por levedura *Candida Sphaerica* UCP0995 com 15,0% de carboidrato e 70,0% de lipídio.

A Figura 12 apresenta a caracterização molecular do biossurfactante isolado em gel de poliacrilamida, que apresentou uma única banda proteica em presença de condições desnaturante e redutora, indicando homogeneidade eletroforética, e exibiu uma massa molecular em torno de 14,3 kDa, que se aproxima a massa molecular da lisozima, que é de 14,7 kDa e sob as condições nativas a banda proteica revelando um caráter ácido.

Figura 12 – Caracterização molecular do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559: (A) proteína marcador padrão utilizado como se segue: albumina de soro bovino (65 kDa); albumina de ovo de galinha branca (45 kDa); anidrase carbónica (29 kDa) e lisozima (14,7 kDa). (B) 11,5% de SDS-PAGE da proteína corada com Coomassie. (C) de 11,5% SDS-PAGE da proteína reduzindo condição com 2-mercaptoetanol e (D) a condição de não redução



A Tabela 4 apresenta os valores e resultados da composição química e da caracterização do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 após 96 horas de fermentação em meio de produção suplementadas em 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona.

Tabela 4 – Composição química e caracterização molecular do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559

Composição química	Valores e resultados
Proteínas totais	20,0 %
Carboidratos totais	38,0 %
Lipídios totais	12,0 %
Massa molecular	14,3kDa
Coloração Schiff	Fracamente positivo
Caráter iônico	ácido

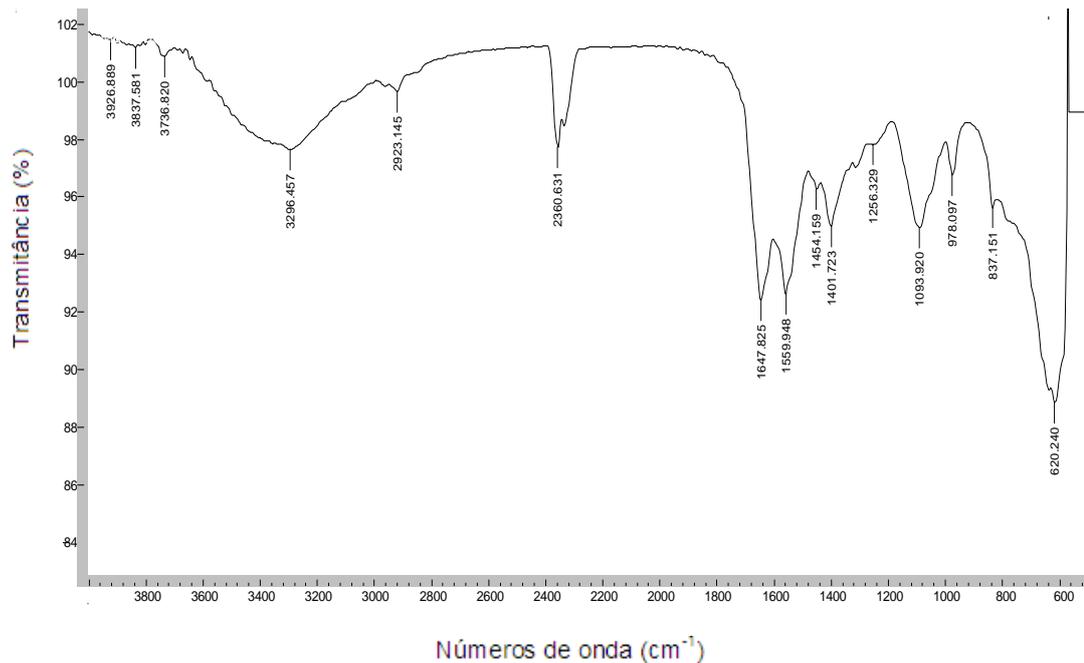
A Tabela 5 apresenta as principais frequências dos grupos funcionais do biossurfactante isolado analisado pelo método de FIR-ATR, referente à ilustração dos picos espectrais demonstrados na Figura 13.

Tabela 5 – Análise dos picos espectrais característicos do biossurfactante isolado produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 pelo método de FIR-ATR

Grupos funcionais	frequências características (cm ⁻¹)
Confirmando a presença de hidroxila	3295 cm ⁻¹
Fracas bandas referentes às vibrações de deformações axial C-H de carbonos sp ³	2923 cm ⁻¹
Amidas e amidas II bservadas, devido à deformação angular	1647 e 1559 cm ⁻¹
Deformação axial de C=C de anel aromático	1454 e 1401 cm ⁻¹
Banda larga de média intensidade de axial de C-O	1093 cm ⁻¹
Banda intensa	620 cm ⁻¹

A Figura 13 demonstra os principais picos característicos dos grupos funcionais que foram detectados pelo método FIR-ATR a seguir.

Figura 13 – A análise preliminar dos espectros com os principais grupos funcionais apresentados por biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 e pelo método FIR-ATR



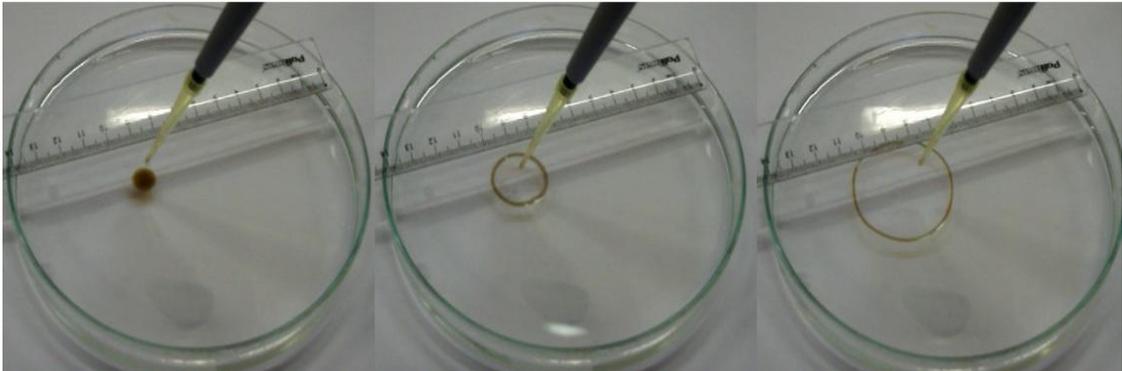
Conforme a análise espectral do biossurfactante solubilizado em metanol, foram visualizadas bandas intensas características de alguns grupos funcionais como a hidroxila. A baixa intensidade deste sinal indica que na molécula não há cadeias longas de grupos CH₂ e CH₃; amidas e amidas II como NH₂ e NH, C=C de anel aromático; C-O álcool primário; C=C bem como a presença de haletos como cloro, bromo ou iodo.

As análises de infravermelho do biossurfactante indicaram que a sua estrutura química é composta por peptídeos. Os perfis químicos obtidos por análise em infravermelho em água foram idênticos, apresentando polaridades diferentes, muito embora apresente características anfífilas. Uma análise estrutural detalhada do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 se faz necessária para melhor definição de sua estrutura química.

6 Teste de dispersão e agregação de óleo

A dispersão do biossurfactante foi determinada usando um substrato hidrofóbico óleo de motor. A Figura 14 apresenta a dispersão e agregação do óleo após a adição do líquido metabólico contendo o biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559, evidenciado após 30 segundos em temperatura ambiente. A abertura do alo formada pelo biotensoativo no substrato foi em torno de 53% mostrando propriedades tensoativas desse composto (MORIKAWA et al., 1993).

Figura 14 – Ilustração da dispersão e agregação do óleo de motor após a adição do biotensoativo de *Streptomyces* sp. DPUA1559 cultivado em meio mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona após 96 horas de fermentação



A atividade produzida no substrato hidrofóbico mostrou que, após a adição da solução metabólica do biotensoativo, foram verificadas visualmente a dispersão e posteriormente a agregação do óleo de motor na superfície da água destilada em placa de Petri, sugerindo as características e propriedades tensoativas do biossurfactante.

Foi reportado por Santos (2012) que o teste de dispersão com o biossurfactante Bioelan após extração da parte lipídica teve possivelmente a tensão superficial suprimida. Diante do exposto, os resultados obtidos do biossurfactante de *Streptomyces* sp.DPUA1559 são promissores, podendo ser produzidos pela otimização dos bioprocessos e sugerindo aplicação nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e em biorremediação de petróleo e derivados.

7 CONCLUSÕES

O estudo foi realizado utilizando uma estirpe de *Streptomyces* sp. DPUA1559 e demonstrou um potencial para produzir moléculas com atividade surfactante e emulsificante na presença do óleo de soja residual e peptona. A utilização de um planejamento fatorial 2^2 aplicando um delineamento composto central como ferramenta estatística foi de importância para previsão preliminar de um modelo estatístico, no qual foram estabelecidas as condições como pH e temperatura, com efeitos estatisticamente significativos na produção do biossurfactante.

O biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 mostrou estabilidade diante das condições ambientais extremas de pH, temperatura e concentrações de salinidade e não apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e às sementes vegetais de alface (*Lactuca sativa* L.) e repolho (*Brassica oleracea* L.)

A caracterização do biossurfactante isolado revelou um novo surfactante com única banda proteica indicando homogeneidade eletroforética e baixa massa molecular, que sob condições nativas apresenta um caráter ácido e natureza glicoproteica. A estrutura química é composta por peptídeos com polaridades diferentes, apresentando um grupo funcional na constituição por peptídeos. Os resultados são promissores quanto à possibilidade de aplicação do biossurfactante, sugerindo investigações futuras para aplicação biotecnológica e industrial e otimização dos bioprocessos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUSEOUD, M. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of iosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p.143–151, 2008.

ARAÚJO, L. V. et al. Rhaminolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, p. 481-488, 2011.

ATKINSON, A. C.; DONEV, A. N. **Optimum Experimental Designs**. Oxford: Clarendon Press, 1992. (Oxford Statistical Science Series 8).

BANAT, I.M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 427–444, 2010.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciências e Tecnologias de Alimentos**, v.28, n. 4, p. 979-985, 2008.

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

DAVIS BJ. Disk electrophoresis: method and application to human serum proteins. **Annal ny Acad Sci**, v. 121, p. 404-27.1964.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production, Characterization, and Properties of Sophorolipids from the Yeast *Candida bombicola* using a Low-cost Fermentative Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.158, p. 663–674, 2009a.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p. 350-356, 1956.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

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

GHURYE, G.L.; VIPULANANDAN, C.; WILLSON, R.C. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 661-666, 1994.

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

GUDINA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 76, p. 298-304, 2010.

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

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

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

KIM, S.H. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 2000.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.5, p. 227-680, 1970.

LeOra Software. **POLO-PC: A User's Guide to Prohibit Logit Analyses**; Berkely, 1987.

LIMA e SILVA et al. Produção de biosurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato, **Exacta**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.

LIMA, R.A.; ANDRADE, R.F.S.; SANTOS, L.Q.; TAKAKI, G.M.C. Produção de biosurfactante por *Pseudomonas flourescens* em caldo de abacaxi (*Anana comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remorção de derivados do petróleo. **Exacta**, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

LUNA, J.M. et al. Caracterização, propriedades de superfície e atividade biológica de um biotensioativo produzido a partir de resíduos industriais por *Candida sphaerica* UCP0995 para aplicação em indústria de petróleo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

MATEUS, N. B. **O delineamento composto central e sua viabilidade de uso em algumas áreas de pesquisa**. 98 p. 2001. Dissertação de (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 31-45, 1982.

MORIKAWA, M. et al. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS 38. **Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

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

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

MUTH, G.; BROLLE, D. F.; WOHLLEBEN, W. Genetics of *Streptomyces* In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. 2. ed. Washington: ASM Press, p. 35, 1999.

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

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3rd. ed. New York: J. Wiley & Sons, p. 649, 1991.

PRIDHAM, T.G. et al. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, v. 1, p. 947-953, 1957.

QUINN, P. J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Mowsby-Year Book Europe Limited, 1994.

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

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

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

SANTOS, E.F. **Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante por *Streptomyces* spp. Isolados da região amazônica**. 2012, 158 p. Tese de doutorado em Biociência Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

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

SILVA, T.A.L; ARAÚJO, H.W.C; TAMBOURGI, E.B; SILVA, A.A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Potencial biotecnológico de uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato. **Exacta**, v. 7, n. 1, p. 31-37, 2009.

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

THANOMSUB, B. et al. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p. 588-592, 2004.

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

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

Yu-Chi Chen et al. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 62-69, 2012.

CAPÍTULO III

Avaliação da atividade biológica do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica frente às linhagens de *Microsporum canis* isolados de micoses superficiais de cães

Ana Paula Pereira dos Santos¹, Leonie Asfora Sarubbo² e Ana Lúcia Figueiredo Porto³.

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

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



Artigo 2 – a ser submetido para publicação na Revista Applied Microbiology and Biotechnology

RESUMO

As dermatofitoses são infecções provocadas por fungos filamentosos que utilizam substrato nutritivo como a pele, cabelos e unhas durante a infecção. Neste estudo foi verificada a atividade antifúngica do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica frente às linhagens de *Microsporum canis* isolados de micoses superficiais de cães. A atividade antifúngica foi realizada de acordo com as normas adotadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2002), referente ao método de microdiluição em caldo para susceptibilidade antifúngica em fungos filamentosos nas concentrações de 1,9 a 1000 µg/ml. O método de microdiluição foi utilizado para determinar a CIM e CFM a droga comercial Itraconazol como controle. O método de microdiluição mostrou que a partir da concentração 1,9 µg/ml da solução do biossurfactante as linhagens de *M. canis* apresentaram inibição do crescimento. Para as linhagens de *M. canis* 14 (d) e 15 a concentração inibitória mínima foi em torno de 15,6 µg/ml e a concentração que obteve 100% de inibição foi determinada como a concentração inibitória mínima (CIM) em torno de 31,3 µg/ml na presença do biossurfactante. A partir dessa concentração foi realizado o repique dos poços com zero de crescimento e observado o crescimento fúngico na superfície em meio sólido, onde a concentração fungicida mínima (CFM) foi na concentração de 31,3 µg/ml, sendo observada após sete dias ausência do crescimento fúngico com exceção da linhagem *M. canis* 14a (d), que apresentou apenas inibição de crescimento em torno de 10%. As concentrações da droga comercial Itraconazol apresentaram similaridade na concentração inibitória mínima (CIM) comparada ao biossurfactante usado como agente antifúngico. O CIM₁₀₀ para o biossurfactante foi à concentração que inibiu 100% o crescimento de todas as linhagens de *M. canis*. Os resultados obtidos sugerem aplicação do biossurfactante produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 como um agente antifúngico que poderá ser mais bem explorado em estudos futuros nas indústrias farmacêutica, cosmética e veterinária.

Palavras-chaves: Biossurfactante. *Microsporum canis*. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

Dermatophytoses are infections caused by filamentous fungi using nutritional substrate such as skin, hair and nails during infection. This study verified the antifungal activity of biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolated from lichens of the Amazon region in the face of *Microsporium canis* strains isolated from superficial mycoses in dogs. The antifungal activity was performed according to the standards adopted by the Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2002), referring to the broth microdilution method for antifungal susceptibility in filamentous fungi at concentrations of 1,9 to 1000µl/ml. The microdilution method was used to determine the MIC and MFC Itraconazole commercial drug as control. The microdilution method showed that, starting from the concentration 1.9 mg / ml, solution of biosurfactant strains of *M. canis* showed growth inhibition. For strains of *M. canis* 14 (d) and 15 the minimum inhibitory concentration was approximately 15.6 mg / ml, and the concentration which yielded 100% inhibition was determined as the minimum inhibitory concentration (MIC) of about 31,3 mg/ml in the presence of biosurfactant. From this concentration, the wells were replated with growth, and the observed zero fungal growth on the surface on solid medium, where the minimum fungicidal concentration (MFC) was at a concentration of 31,3 mg/ml, was observed after seven days absence of fungal growth except the lineage *M. canis* 14a (d), which showed only inhibition of growth of around 10%. The concentrations of the commercial drug Itraconazole showed similarity in the minimum inhibitory concentration (MIC) compared with biosurfactant used as an antifungal agent. The MIC₁₀₀ to the biosurfactant was the concentration at which 100% inhibited the growth of all strains of *M. canis*. The results suggest the application of biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA1559 as an antifungal agent that can be further explored in future studies in industrial pharmaceutical, cosmetic and veterinary medicine.

Keywords: Biosurfactant. *Microsporium canis*. Antifungal activity.

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos microbianos que apresentam atividades superficiais e emulsificantes. São moléculas anfipáticas que atuam na redução da tensão superficial e interfacial. Essas moléculas possuem baixa toxicidade, boa aceitação ecológica, estabilidade frente às condições ambientais extremas e são biodegradáveis (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; SARUBBO; LUNA; CAMPOS-TAKAKI, 2006; RUFINO et al., 2011).

Os biossurfactantes podem ser obtidos através de matérias-primas e subprodutos provenientes do processamento industrial. De acordo com os tipos de substratos utilizados para produção dos biossurfactantes e as condições planejáveis, sua estrutura química e composição podem ser alteradas, apresentando algumas propriedades seletivas exibindo alta atividade emulsificante a compostos hidrofóbicos, além de potencializar altas atividades antimicrobianas frente a micro-organismos específicos como as bactérias gram-positivas (SARUBBO; FARIAS; CAMPOS-TAKAKI, 2007; LUNA; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2009; RUFINO et al., 2011).

De acordo com Rufino et al. (2011), os biossurfactantes possuem a capacidade de se acondicionarem em sítios no qual as bactérias vão se aderir inibindo assim a adesão bacteriana. Alguns biossurfactantes produzidos como o ramnolipídios e a surfactina apresentaram propriedades específicas atuando na interrupção de biofilmes, produzindo ação antimicrobiana e anti-adesiva em contrapartida em bactérias como *Listeria monocytogenes* (ARAÚJO et al., 2011).

Nesse sentido, considerado a importância dos biossurfactantes como agentes de superfície penetrante e potencial inibidor na aderência celular em locais de sítios invasivos por micro-organismos patogênicos para a medicina humana e veterinária, o presente estudo teve como objetivo verificar a atividade biológica do tensoativo produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica frente às linhagens de *Microsporum canis* isolados de micoses superficiais de cães.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e manutenção

O micro-organismo utilizado foi o *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquens da Região Amazônica, pertencente à Coleção do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). O micro-organismo foi mantido em cultura estoque de criotubos contendo glicerol a 10% (v/v) e conservado em freezer a -18°C . Foi ativado em meio ISP-2 líquido constituído por extrato de malte a 1% e extrato de levedura a 0,4% (PRIDHAM et al., 1957) em Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml do meio de cultivo e esterilizados a 121°C por 20 minutos sob condições de agitador orbital (B. BRAUN) a 150 rpm, 28°C por 48 horas.

2.2 Meio de produção

Para a produção do biossurfactante, a cultura foi crescida em meio mineral contendo 1% de óleo de soja residual de fritura e 1% de peptona. O pH do meio base de produção foi ajustado para 7,0 com uma solução de NaOH a 1,0 M. O meio foi transferido em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml do meio de cultivo e acrescido 2% do inóculo a 10^8 UFC/mL de esporos do micro-organismo, sendo inseridos em cada frasco e conduzidos em agitador orbital (B. BRAUN) sob as condições 200 rpm e temperatura 28°C , durante 96 horas.

2.3 Isolamento do biossurfactante

Após o cultivo do *Streptomyces* sp. DPUA1559 o fermentado foi centrifugado a 10.000 g durante 20 minutos e filtrado em papel de filtro. O líquido metabólico livre de células foi acidificado com uma solução de HCl a 6,0 M e submetido a extração com uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1 v/v) em funil de separação com capacidade de 500 ml e a mistura agitada vigorosamente por 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases (JAVAHERI et al., 1985).

A fase orgânica contendo o biossurfactante foi removida e o processo repetido por mais duas vezes. O produto concentrado foi centrifugado a $3.000 \times g$ durante 5 minutos e o *pellet* formado foi removido e suspenso com água Milli-q e neutralizado com solução de NaOH 1M para pH 7,0. A suspensão foi adicionada

numa placa de Petri estéril e preservada em estufa de secagem a 37°C por 12 horas, macerado e pesado até peso constante para determinar o rendimento em g/l, e o produto obtido considerado como biossurfactante isolado.

2.4 Micro-organismo

Foram isoladas sete linhagens de dermatófitos da espécie *Microsporum canis* obtidos de casos de micoses superficiais de cães atendidos no Hospital de Medicina Veterinária pertencente à Universidade Federal Rural de Pernambuco. As linhagens de *Microsporum canis* foram processadas no Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO/UFRPE), sendo preservadas em óleo mineral (SHERF, 1943).

2.5 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma – Aldrich, USA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS) a 0,165 M (Sigma – Aldrich, USA). O meio foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade de 0,22µm (millipore).

2.6 Extrato do biossurfactante

O extrato do biossurfactante isolado foi preparado com base na Concentração micelar crítica (CMC) em uma concentração estoque de 1000 µg/ml e solubilizado em 500µl de água destilada e 500µl do ácido morfolinepropanesulfônico (MOPS) a 0,165 M, para a obtenção de uma concentração final de 1000 µg/ml, e as concentrações utilizadas variaram de 1,9 a 1000 µg/ml.

2.7 Preparação do inóculo

As linhagens de dermatófitos são catalogadas pelas seguintes numerações (2, 3, 14a, 14, 15, 16 e 17) e foram cultivadas em tubos contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) em estufa BOD à temperatura de 30° C durante 15 dias. Os inóculos foram padronizados de acordo com o procedimento adotado pelo CLSI (2002) e descrito por Fernández-Torres et al. (2002). O método de

microdiluição em meio líquido foi realizado de acordo com o documento M38-A (CLSI, 2002) e segundo a metodologia descrita por Fernández-Torres et al. (2002), adaptada para dermatófitos. As amostras de fungos foram suplementadas com a solução do extrato em cada poço a partir da concentração de 1000µl/ml.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

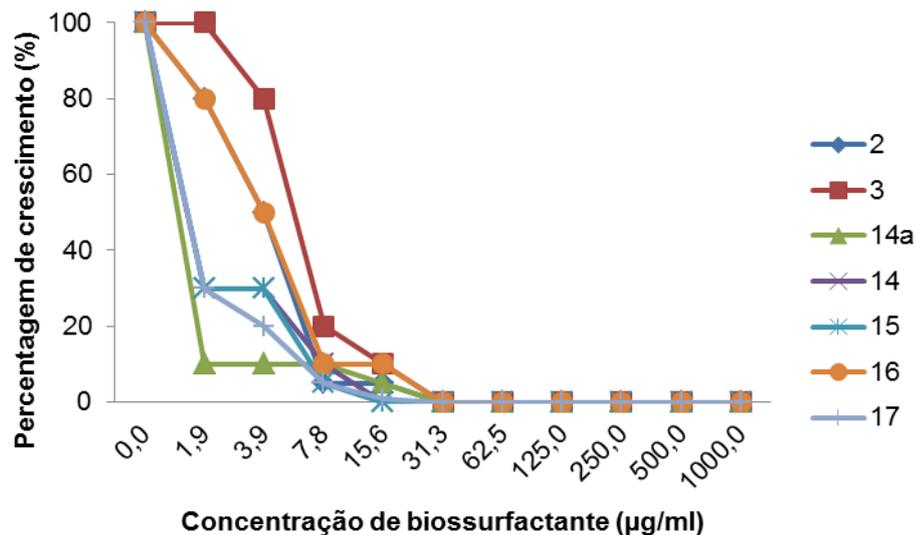
As dermatofitoses são infecções fúngicas provocadas por fungos filamentosos queratinofílicos, que utilizam a queratina de pele, cabelos e unhas como substrato nutritivo durante a infecção, sendo as mais comuns as cutâneas que acometem humanos e animais não humanos. Os dermatófitos estão classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, de acordo com a morfologia e estrutura dos conídios, pelo seu hospedeiro e habitat natural. As espécies isoladas mais frequentes são dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, sendo o *M. canis* a espécie a de maior incidência em animais e podem ser fonte de contaminação em humano (LACAZ et al., 2002; MINAMI, 2003; FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2009).

A utilização de extratos brutos ou óleos essenciais de plantas como agentes antifúngicos naturais tem sido uma alternativa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de micoses (FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2009). Como reporta a literatura, uma bactéria *Pseudomonas aeruginosa* AT10 produziu diferentes raminolipídios que apresentaram atividades antifúngicas (ABALOS et al., 2001). Estudos mostram a produção de um fungicida glicolipídico, com baixa massa molar, sintetizado por uma levedura *Pseudozyma fusiformata* (GOLUBEV et al., 2001).

Na Figura 1 estão apresentados os resultados obtidos quanto à atividade antifúngica do extrato do biossurfactante isolado frente às linhagens de *M. canis* (2, 3, 14a, 14, 15, 16 e 17). De acordo com os resultados, os fungos foram susceptíveis na presença do biossurfactante em baixa concentração em torno de 1,9 µg/ml apresentando diminuição de crescimento. A concentração inibitória mínima (CIM) para as linhagens de *M. canis* 14 (d) e 15 (e) foi em torno de 15,6 µg/ml, enquanto a concentração 31,3 µg/ml obteve 100% de inibição de crescimento para as demais linhagens, sendo determinada como a concentração inibitória mínima (CIM) na

presença do biossurfactante isolado frente às sete linhagens de *M. canis* testadas, que foram isoladas de micoses superficiais de cães.

Figura 1 – Ilustração da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às linhagens de *Microsporium canis* isolados de casos de micose superficial de cães



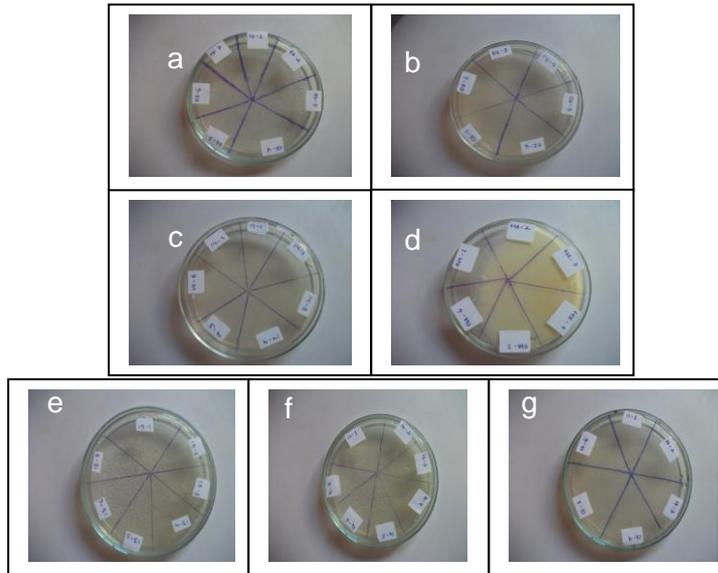
Após avaliação da leitura visual dos poços feita em microplaca com base na CLSI (2002) e conforme Siqueira et al. (2009), foi realizado o repique dos poços que apresentaram ausência de crescimento dos fungos para determinar a concentração fungicida mínima (CFM).

As placas semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C de temperatura, durante sete dias, para leitura visual e confirmação dos resultados. Foram determinadas a CIM e a CFM para cada poço contendo as concentrações determinadas da solução estoque do biossurfactante isolado, assim como a concentração capaz de inibir o crescimento de todas as amostras analisadas (CIM₁₀₀).

A Figura 2 ilustra a atividade antifúngica do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às seguintes linhagens de *M. canis*: *M. canis* 2 (a), *M. canis* 3 (b), *M. canis* 14 (c), *M. canis* 15 (e), *M. canis* 16 (f) e *M. canis* 17 (g). De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras repicadas em meio sólido apresentaram uma concentração fungicida mínima (CFM) a partir da concentração

31,3 μ g, com exceção da linhagem *M. canis* 14a (d), que apresentou apenas inibição de crescimento em torno de 10%.

Figura 2 – Ilustração da atividade fungicida (CFM) do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às linhagens de *Microsporium canis* isolados de casos de micose superficial de cães: *M. canis* 2 (a), *M. canis* 3 (b), *M. canis* 14 (c), *M. canis* 14a (d), *M. canis* 15 (e), *M. canis* 16 (f) e *M. canis* 17 (g)



Na Tabela 1 são apresentados os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (MFC) das linhagens de *M. canis* na presença do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 e da concentração inibitória mínima (CIM) e do Itraconazol (droga comercial). O CIM₁₀₀ para o biossurfactante foi à concentração em torno de 31,3 μ g/ml, que foi testado para as linhagens de *M. canis*.

Tabela 1 – Valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) da atividade antifúngica do biossurfactante isolado de *Streptomyces* sp. DPUA1559 frente às linhagens de *Microsporum canis*

Amostras	Biossurfactante	CIM ($\mu\text{g/ml}$) biossurfactante	CFM ($\mu\text{g/ml}$) biossurfactante
<i>Microsporum canis</i> (02)	1,9 - 31,3	31,3	31,3
<i>Microsporum canis</i> (03)	1,9- 31,3	31,3	31,3
<i>Microsporum canis</i> (14)	1,9- 15,6	31,3	31,3
<i>Microsporum canis</i> (14a)	1,9- 7,8	15,6	15,6
<i>Microsporum canis</i> (15)	1,9- 7,8	15,6	15,6
<i>Microsporum canis</i> (16)	1,9- 15,6	31,3	31,3
<i>Microsporum canis</i> (17)	1,9- 15,6	31,3	31,3

4 CONCLUSÃO

O biossurfactante produzido pela bactéria *Streptomyces* sp. DPUA1559 apresentou atividade antifúngica frente às várias linhagens de *M. canis*, podendo ser utilizado em estudos futuros como agente antifúngico, apresentando alta atividade dependendo da concentração utilizada frente a fungos filamentosos ou patógenos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A. et al. Physicochemical and anti-microbial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, p.1367-1371. 2001.

ARAÚJO, L. V. et al. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, p. 481-488, 2011.

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI): Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos. **Norma aprovada, M38-A**, v. 22, n. 16. 2002.

FERNÁNDEZ-TORRES, B. et al. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 3999-4003, 2002.

FRIAS, D.F.R, KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n. 2, p. 216-220, 2009.

GOLUBEV, W.I.; KULAKOVSKAYA, T.V.; GOLUBEVA, W. The yeast *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821 producing an antifungal glycolipid. **Microbiology**, v. 70, p.553-556. 2001.

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

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Editora Savier, 1104, 2002.

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

MINAMI, P.S. Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n.1, p. 10, 2003.

PRIDHAM, T.G. et al. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Annual**, v. 1, p. 947-953, 1957.

RUFINO, R.D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1–5, 2011.

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

SARUBBO, L.; FARIAS, C.B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*, **Current Microbiology**. v. 54, p. 68-73, 2007.

SHERF, A.F. A method for maintaining *Phytomonas sepedomica* for long periods without transfer. **Phytopathology**, v. 31, p. 30-32, 1943.

SIQUEIRA, A.B.S. et al. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Applied Microbiology**, v. 48, p. 90-96, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto aos objetivos propostos neste trabalho, foi verificado que o micro-organismo *Streptomyces* sp. DPUA1559 foi capaz de produzir um tensoativo na presença dos substratos utilizados. O óleo de soja residual de fritura foi reaproveitado como fonte de carbono de baixo custo, evitando assim o seu desperdício, promovendo a conservação do meio ambiente.

O biossurfactante produzido promoveu a redução da tensão superficial, emulsificação em compostos hidrofóbicos com polaridades diferentes e não apresentou toxicidade frente às sementes de vegetais testadas. Quanto à toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, foi observado que a toxicidade gerada pelo biossurfactante produzido depende da concentração utilizada.

Tendo em vista a caracterização preliminar por espectros dos principais grupos funcionais e molecular do biossurfactante produzido e purificado por solventes em diferentes graus de polaridades, o biossurfactante produzido poderá ser mais bem explorado em trabalhos futuros com outras ferramentas mais específicas, como a Ressonância Nuclear Magnética (RNM) e Espectrometria de Massa de Cromatografia Líquida (LC-MS), colaborando para uma análise estrutural mais detalhada deste composto. O biossurfactante apresentou uma excelente resistência em contrapartida às linhagens de *Microsporium canis*, apresentando boa atividade fungistática.

Diante do exposto, o biossurfactante no futuro poderá ser utilizado para aplicação nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e em biorremediação de petróleo e derivados e medicina veterinária.

APÊNDICE



XXI ALAM

Congresso Latinoamericano
de Microbiologia

SANTOS - BRASIL

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR ACTINOMYCETES SP. A-18 UTILIZANDO ÓLEO RESIDUAL DE FRITURAS com a autoria de: SANTOS, A.P., SILVA, M.D.S., RIBEIRO, M.C.S., SANTOS, E.F., SARUBBO, L.A., PORTO, A.L.F. foi apresentado na forma de pôster durante o XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM).

De 28 de outubro a 1 de novembro de 2012 Mendes Convention Center, Santos, SP

Prof. Dr. Carlos P. Taborda

Presidente da Associação Latinoamericana de Microbiologia

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

Presidente do XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia

Organização e realização





Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado:

PRODUCTION OF BIOSURFACTANT AND EMULSIFYING PROPERTY BY ACTINOMYCETO DPUA A-18 ISOLATES FROM THE AMAZON REGION

ANA PAULA PEREIRA DOS SANTOS SANTOS , MITALIENE DE DEUS SOARES SILVA SOARES SILVA, MILENA FERNANDES DA SILVA SILVA, EDUARDO FRANCISCO DOS SANTOS SANTOS, GABRIEL NEVES DA MOTTA SILVEIRA SILVEIRA, LEONIE ASFORA SARUBBO SARUBBO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO PORTO

Foi apresentado durante a XI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq e 4th International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology, realizada em Recife, Pernambuco, no período de 5 a 7 de dezembro de 2012

Recife, 7 de dezembro de 2012

Vera Lucia de Lima

Profa. Dra. Vera Lucia de Menezes Lima
Presidente da Comissão Organizadora

Prof. Dr. Moacir Wagner
Presidente da SBBq



**Sociedade Brasileira de Bioquímica e
Biologia Molecular - SBBq**



Do laboratório à sociedade: aprimorando ideias e melhorando a qualidade de vida

Certificamos que o trabalho intitulado “**Produção de biossurfactantes produzido por *Streptomyces* sp. DPUA1559 utilizando óleo de soja residual de fritura**” foi apresentado por Santos, A.P; Silva, M.D.S; Silva, M.F; Santos, E.F.; Sarubbo, L.A; Porto, A.L.F no **V Simpósio de Inovação em Ciências Biológicas**, realizado na Universidade Federal de Pernambuco no período de 7 a 9 de Novembro de 2012, em Recife – Pernambuco.

Recife, 09 de Novembro de 2012.

 Maria Tereza dos Santos Correia
 Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências
 Biológicas (PPGCB –UFPE)

 Thiago Pajeú Nascimento
 (Presidente do V SICBIO)

Organização:



Apoio:



UNIVERSIDADE
 FEDERAL
 DE PERNAMBUCO



BIOSYSTEMS



PROEXT
 PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO