

Material de estudo que complementa as aulas Fermentação como Processo Unitário e Produção de Biomoléculas por Processos Fermentativos, da disciplina Biotecnologia Farmacêutica, ministradas pelo Prof. Ricardo Pinheiro

Aula 1: FERMENTAÇÃO COMO PROCESSO UNITÁRIO

O sucesso de um dado processo fermentativo depende muito de uma correta definição de quatro pontos básicos: o microrganismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto.

Na verdade, esses quatro pilares interagem enormemente, sendo necessário buscar defini-los de forma conjunta, levando em consideração, aspectos biológicos e econômicos, o que torna bastante complexa esta adequada definição. Para tornar clara essa ideia, pode-se mencionar que sempre se pretende empregar meios de cultura baratos, mas deve-se lembrar que o micro-organismo deve encontrar neste meio condições adequadas para realizar a conversão desejada.

Em termos de formas de condução do processo fermentativo, seria difícil imaginar a produção presente de etanol no Brasil, caso não se operasse os biorreatores em sistema descontínuo alimentado, ou mesmo contínuo, porém com o reciclo das células. Da mesma forma, o grande avanço alcançado pela digestão anaeróbia no tratamento biológico de efluentes, deveu-se muito ao surgimento dos reatores contínuos operados com fluxo ascendente e reciclo interno de células.

As operações finais para a recuperação do produto (operações de "downstream"), são igualmente da mais alta importância. Sabe-se que a melhor forma presentemente para a recuperação do etanol, após uma fermentação alcoólica, é a operação de destilação, mas ela incide significativamente no custo do produto final, em virtude da energia necessária para a sua execução. No entanto, a importância de uma adequada definição das operações de recuperação do produto, fica mais clara quando se aborda a produção de produtos de alto valor agregado, como a produção de antibióticos, enzimas, ou outras proteínas (insulina, bacteriocina, hormônios de crescimento, vacinas, entre outros. Para esses casos, as operações de recuperação do produto podem ser responsáveis por 50 a 90% do custo do produto final.

Cabe, portanto, conforme salientado anteriormente, abordar alguma reflexão sobre microrganismos e meios de cultura que podem ser eventualmente empregados em uma operação industrial.

De fato, os micro-organismos que possam ter interesse industrial, podem ser obtidos basicamente das seguintes formas: isolamento a partir de recursos naturais, compra em coleções de culturas, obtenção de mutantes naturais, obtenção de

mutantes induzidos por métodos convencionais e obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética. O isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais, tais como solo, água, plantas etc., sempre foi uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial. A compra em coleções de culturas é bastante viável, tendo em vista a existência de muitas coleções de culturas em vários países. O contato com essas coleções é atualmente muito facilitado, podendo-se utilizar os recursos da Internet para tal tarefa. Alterações naturais não são, de forma alguma, interessantes do ponto de vista de um processo fermentativo, mas eventualmente podem gerar novas linhagens que apresentem interesse prático,

Por outro lado, submeter suspensões de células ou esporos a radiações ultravioleta ou a substâncias químicas mutagênicas, pode ser interessante, desde que se mutem para a direção desejada. Finalmente, nas últimas décadas, as técnicas de engenharia genética também designadas por técnicas ou tecnologia de DNA recombinante, sem dúvida trouxeram um imenso avanço nas possibilidades de se obter células mais produtivas, ou células produtoras de substâncias que normalmente não produzem.

Em suma, para uma aplicação industrial, espera-se que os micro-organismos apresentem as seguintes características gerais:

- apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto;
- permitir o acúmulo do produto no meio, de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo fermentado;
- não produzir substâncias incompatíveis com o produto;
- apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- não ser patogênico;
- não exigir condições de processo muito complexas;
- não exigir meios de cultura dispendiosos;
- permitir a rápida liberação do produto para o meio.

Em relação ao meio de cultivo espera-se:

- ser o mais barato possível;
- atender as necessidades nutricionais do micro-organismo;
- auxiliar no controle do processo, como e o caso de ser ligeiramente tamponado, evitando assim, variações drásticas de pH, ou evitar uma excessiva formação de espuma;
- não provocar problemas na recuperação do produto;

- os componentes devem permitir algum tempo de armazenagem, a fim de estarem disponíveis todo o tempo;
- ter composição razoavelmente fixa;
- não causar dificuldades no tratamento final do efluente.

Como se sabe, os micro-organismos utilizam como fonte de carbono, e energia, diversos açúcares, tais como glicose, sacarose, frutose, ou ainda polissacarídeos, como o amido, inulina e a celulose. Como fonte de nitrogênio são frequentemente utilizados sais, como o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou aminoácidos, ou a ureia. Como fonte de fósforo utilizam-se os fosfatos solúveis, como o monoamônio fosfato (MAP), ou o diamônio fosfato (DAP), os quais passam a ser fontes de nitrogênio e fósforo simultaneamente. Ainda, necessita-se adicionar outros elementos, como: Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn, Co etc., em concentrações frequentemente muito reduzidas, na forma de seus sais solúveis.

Em relação aos biorreatores ou fermentadores podemos dizer que são concebidos em função do tipo de processo e dos agentes biológicos empregados. Portanto, podem possuir características bem distintas no que se refere a fenômenos de transporte (calor, massa e quantidade de movimento).

Cerca de 90 % dos reatores utilizados industrialmente são do tipo reator de mistura STR (agitados mecanicamente). Atualmente, há um grande interesse por outros tipos de reatores, mas a maioria dos processos ainda se encontra em escala de bancada ou semi-piloto. A capacidade de um biorreator é bastante variável, sendo dependente do processo em questão:

- » 1 a 2 m³ – cultivo de patógeno ou células animais ou vegetais. Normalmente para a produção de substâncias ligadas à saúde.
- » 100 a 200 m³ – enzimas, antibióticos e vitaminas.
- » Acima de 1000 m³ – processos que exigem pouca assepsia, como fermentação alcoólica e tratamento biológico de resíduos.

Um biorreator do tipo STR consiste em um vaso cilíndrico sendo comuns relações entre a altura (H) e o diâmetro (D) de 1:1, 2:1 ou 3:1. Normalmente, um biorreator é equipado com Chicanas (com largura 0,1D), utilizadas para evitar a formação de vórtice. De fato, O agitador é montado no eixo central, podendo possuir ao longo de sua altura uma série de turbinas, as quais podem ser de diferentes tipos. Basicamente a função da agitação e aeração no biorreator é simplesmente homogeneizar o meio de cultivo e dispersar os gases no líquido, diminuindo, assim, o tamanho das bolhas, melhorando a transferência de oxigênio.

Os reatores agitados pneumaticamente se caracterizam basicamente pela ausência de agitador mecânico, sendo o líquido agitado pelo borbulhamento de gás (normalmente ar). Apresentam menor tensão de cisalhamento, o que torna atraente para o cultivo de células animais e vegetais. Portanto, devemos partir de algumas premissas para selecionar um biorreator ideal. Em particular devemos levar em conta:

1. Natureza do biocatalisador
 - » Estabilidade da cepa;
 - » Aeróbio ou anaeróbio;
 - » Tamanho e forma das células.

2. Propriedades do meio de fermentação
 - » Propriedades físicas do substrato (líquido ou sólido);
 - » Componentes do meio sensíveis ao calor;
 - » Propriedades reológicas (densidade e viscosidade);
 - » Formação de espuma.

3. Parâmetros bioquímicos do processo
 - » Taxa de transferência de oxigênio;
 - » Dependência da temperatura e pH.

Aula 2: Tipos de processos fermentativos

Processo descontínuo ou batelada (*batch*): Este processo vem sendo utilizado pelo homem desde a Antigüidade, sendo o mais empregado para obtenção de vários produtos fermentados, destacando-se a produção de medicamentos, alimentos e bebidas. O modo de operação é descrito da seguinte forma: Inicialmente adiciona-se o inóculo, e em seguida o meio de cultivo esterilizado no biorreator de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas (pH, temperatura, agitação, aeração etc...). No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio (na forma de ar), antiespumante, e ácido ou base para controle do pH. Terminado o cultivo, descarrega-se a dorna e o meio fermentado segue para os tratamentos finais. Então, deve-se lavar a dorna, esterilizá-la e recarregá-la novamente com meio de cultivo e inóculo. Este processo permite a recirculação de micro-organismos.

Características:

- Sistema pode ser fechado
- Possibilita controle de assepsia

- Possibilidade de separar a produção por lotes
- Rastreabilidade dos lotes
- Possibilidade de uso do reator para outros processos

O processo descontínuo apresenta a desvantagem de possuir tempo morto, isto é, tempo em que o biorreator não está sendo usado para o processo fermentativo propriamente dito. O tempo morto consiste no tempo de carga e descarga da dorna e período correspondente a lavagem e esterilização do fermentador.

Processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada (*fed batch*): é definido como uma técnica em processos microbianos onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. Em alguns casos, todos os nutrientes são gradualmente alimentados à dorna. Adicionalmente, outros autores estendem esse conceito para o acréscimo de aditivos, tais como precursores de produtos. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo e a adição do meio de cultivo pode ser de forma contínua ou intermitente. Mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema.

Características:

- Controle do metabolismo celular
- Controle da sobrevivência do Microrganismo
- Controle da inibição pelo produto e pelo substrato
- Controle da indução
- Explora o efeito Crabtree em leveduras
- Viabiliza obtenção de altas concentrações celulares
- Cinética microbiana pode ser ajustada

Processo contínuo: não sofre interrupções ao longo do tempo, sendo operado por meio de alimentação contínua de meio de cultura ao biorreator e por uma correspondente retirada contínua de caldo fermentado, de forma a se ter o volume de reação constante, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário (“*steady-state*”).

Características:

- Economia de dornas e menor área industrial
- Possibilidade de menor consumo de anti-espumantes
- Redução de mão-de-obra

- Automação mais fácil
- Maior produtividade (produção por volume instalado)
- Uniformidade na produção
- Menos pontos de amostragem
- Economia de insumos
- Maior dificuldade de manter assepsia
- Maior dificuldade para rastreabilidade
- Operação por longos períodos de tempo
- Ausência de tempos mortos
- Condições constantes de cultivo

Aula 3: BIOMOLÉCULAS OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO

Existem inúmeras biomoléculas e produtos obtidas por processos fermentativos. Aqui vão alguns exemplos:

- Substâncias químicas farmacêuticas - antibióticos e esteroides
- Substâncias químicas de valor comercial - solventes, etanol e enzimas
- Suplementos alimentares - massa de leveduras, bactérias e algas (fonte de proteínas)
- Bebidas alcoólicas - vinho e cerveja
- Agentes imunizantes - vacinas
- Bioinseticidas - microrganismos como inseticidas (espécies de *Bacillus*)
- Aplicações na mineração e indústria de petróleo - recuperação de metais e de óleo.

Produção industrial de etanol

a) Produção de levedura-mãe:

- Microrganismo: *Saccharomyces cerevisiae*
- Processo:
- Batelada: T = 20°C, pH = 4.0-4.5
- Fed-batch : T = 30-35°C, pH = 4.0-4.5
- Fonte de C: Melaço, Substâncias amiláceas sacarificadas, So = 12%
- Outros nutrientes: Fosfatos, Sais de amônio

b) Pré-sacarificação das substâncias amiláceas:

- Adição de α -amilase em pH 6.0-6.5
- Liquefação: vapor a 150°C por 3 min (ou 60-80°C)
- Sacarificação: adição de α -amilase e glicoamilase (50-60°C)

c) Fermentação:

- Condições: anaeróbicas garantidas pelo desenvolvimento de CO₂ e ausência de agitação

Processo:

- Batelada com ou sem reciclagem: T = 28-30°C
- Contínuo com ou sem reciclagem : T = 35-38°C, pHo = 4.5-5.5, t = 2 d
- Fonte de C: Melaço (15%), Açúcar de cana ou beterraba, Amido sacarificado, Resíduos de sucos de fruta, Soro de leite, SSL + Melaço
- Outros nutrientes: Fosfatos, Sais de amônio, K, Ca, Mg, vitaminas (caso carecerem)

d) Destilação:

- 1a fração (vinhos altos): 60-90%, re-destilação etanol 95%
- 2a fração = vinhos baixos

Produção industrial de solventes

a) Isolamento e conservação das cepas:

- Tratamento térmico de amostras de terra ou estrume
- Incubação anaeróbica em tubo de ensaio
- Tratamento térmico periódico a 90-100°C per 90 s

b) Preparação do inóculo:

- 3 Propagações estéreis sucessivas

c) Preparação do mosto:

- Diluição do amido ou do melaço até 6-7% em açúcares
- Eventuais adições da fonte de N e de vitaminas, pH = 6,6
- Esterilização
- Arrefecimento a 35°C

d) Inóculo:

- Inóculo rápido a T elevada em dorna fechada

e) Fermentação:

1a Etapa (0-15 h):

- Crescimento microbiano
- Produção de butirato e acetoacetato

2a Etapa (15-30 h):

- Consumo de butirato e acetoacetato e produção de acetona e butanol
- Aumento do pH

3a Etapa (30-60 h):

- Lento aumento da concentração dos solventes
- Saponificação
- Término da fermentação
- Recuperação da biomassa rica em riboflavina como forragem

Produção industrial de antibióticos

Antibiótico:

Substância de origem microbiana que a baixa concentração inibe o crescimento de outros micro-organismos.

Metabólito secundário:

Produto de via metabólica secundária, ativada na fase estacionária do crescimento celular.

Campo de aplicação:

- Clínico-médica
- Veterinário
- Zootécnico
- Alimentar

Vantagens:

- Toxidez seletiva ao micro-organismo alvo
- Importante economicamente

Desvantagem:

- Resistência microbiana
- Perda por mutação

Microrganismos produtores:

- Actinomicetos (70%): *Streptomyces* sp.
- Fungos (20%): *Penicillium* sp., *Cephalosporium* sp.
- Bactérias (10%): *Bacillus* sp.

Fermentador:

- Tipo clássico, aerado, a pressão, agitado mecanicamente
- Forma variável, que influencia no rendimento

Processo:

- Descontínuo sem controle
- Descontínuo com controle
- Fed-batch – descontínuo alimentado

Fermentação:

- Condições iniciais favoráveis ao crescimento celular
- Condições finais favoráveis ao rendimento
- Controle da morfologia e concentração celular
- Duração: 4-10 dias.

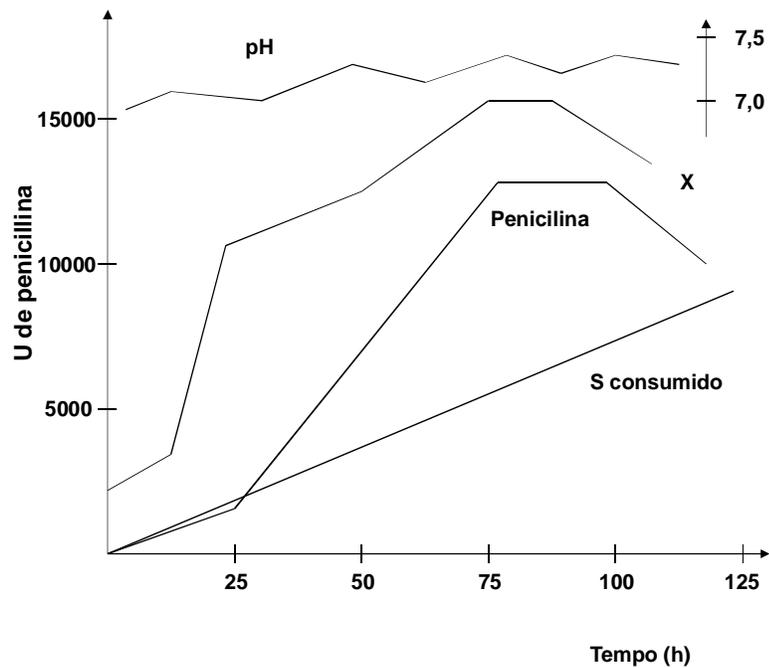


Fig. 1 Gráfico típico representando parâmetros para a produção de penicilina

Produção de bioinseticidas

No contexto de bioinseticidas podemos utilizar insetos parasitóides, predadores, e microrganismos para controlar o nível populacional de pragas principalmente na agricultura e também vetores de doenças. Nesse caso, se utiliza bactérias e fungos porque são facilmente obtidos por fermentação.

Fermentação - Bioinseticidas

Bactérias



Fermentação
Líquida



Fungos



Fermentação
Sólida



Bacteriocinas

As bactérias ácido-láticas (LABs) são micro-organismos amplamente utilizados na indústria de alimentos e em diversos processos fermentativos, tais como no desenvolvimento de produtos cárneos, em vegetais e em muitos laticínios incluindo leite fermentado, queijos, iogurte e manteiga. Entre uma ampla variedade de benefícios relacionados às LABs, as propriedades antimicrobianas permitiram o aumento da vida-de-prateleira de muitos alimentos através do processo de fermentação. A ação antagonista das bactérias lácticas frente a micro-organismos deteriorantes de alimentos pode estar associada à sua capacidade de produzir substâncias inibitórias, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, antibióticos e bacteriocinas.

Algumas espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, utilizadas na fabricação de produtos lácteos fermentados, inibem o crescimento de outros micro-organismos, incluindo os patogênicos intestinais e os deteriorantes, através da produção de compostos antibacterianos ou bacteriocinas. Além disso, essas espécies, citadas anteriormente, podem ser consideradas probióticas. Para isso, tem sido sugerido que umas das desejáveis propriedades das cepas probióticas seja a habilidade de produzir substâncias, como bacteriocinas, a qual oferece o potencial de fornecer vantagens na colonização e competição intestinal do trato gastrointestinal.

Por definição, as bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antimicrobianas sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas e liberadas no meio extracelular. São produzidas por ampla variedade de bactérias, incluindo LABs que apresentam bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, protozoários, fungos e vírus. Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas, particularmente LABs, apresentam amplo espectro como bioconservante de alimentos e como agente terapêutico. Estruturalmente, esses peptídeos são compostos de 20 a 60 aminoácidos e podem ser responsáveis pelas principais propriedades das bacteriocinas, que incluem a tolerância ácida, termo estabilidade e especificidade bactericida (Collins et al., 2010). O mais conhecido exemplo é a nisina, a qual é bioproduzida por muitas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, sendo considerada o protótipo de bacteriocina de bactérias ácido-láticas.

A nisina foi descoberta por Rogers & Whittier (1928), que observaram metabólitos inibitórios de LABs. Foi reconhecida como o primeiro peptídeo natural a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), recebendo a denominação de "Generally Recognized as Safe" (GRAS) para ser usada como um biopreservativo em muitos alimentos processados. Mais de 50 países já fazem uso da nisina como aditivo antagonista nas indústrias de alimentos. Como resultado, pesquisas nesse campo começaram a crescer dramaticamente, e isto levou à descoberta de um grande número de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas.

Podemos utilizar como exemplo interessante de bactéria láctica, o *Lactobacillus plantarum* é um micro-organismo heterofermentativo facultativo. Esta espécie é versátil e heterogênea, a qual pode ser encontrada em diversos nichos, incluindo produtos lácteos, carnes, peixes e muitos produtos fermentados. Além do mais, as cepas de *L. plantarum* têm capacidade de sobreviver ao trânsito gástrico e colonizar o trato intestinal de humanos e outros mamíferos. O número relativamente elevado de genes que codificam as funções reguladoras indica a capacidade de adaptação do *L. plantarum* a essas diversas condições. Além disso, o *L. plantarum* é considerado um micro-organismo probiótico, já que várias propriedades terapêuticas e profiláticas especiais têm sido atribuídas, tais como redução da incidência de diarreia em creches, diminuição da dor e constipação associada à síndrome do intestino irritável e exercer efeito positivo sobre a imunidade em crianças portadoras de HIV. Já tem sido amplamente estudada a capacidade das bactérias lácticas probióticas em fermentar a inulina em produtos lácteos simbióticos, os quais se referem à combinação de prebióticos (fibras alimentares, como a inulina) e probióticos visando promover o crescimento ou desempenho desses micro-organismos benéficos para a saúde. Portanto, torna-se cada vez mais importante estudar as interações entre as bactérias lácticas e estas fibras consideradas prebióticas durante o processo fermentativo, a fim de aumentar a produção de biomoléculas de alto valor agregado, como no caso das bacteriocinas. Algumas das bacteriocinas produzidas por *L. plantarum*, tais como plantaricina C11, plantaricina NA, plantaricina AMA-K, entre outras, mostraram elevada capacidade de controle de micro-organismos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., ou seja, importantes patógenos alimentares. Recentemente, o uso da plantaricina no campo farmacêutico vem tomando destaque, pois este tipo de bacteriocina afeta as células pituitárias cancerosas de rato (células GH4), considerando que as células pituitárias normais são

resistentes ao peptídeo antimicrobiano. Portanto, torna-se cada vez mais importante desenvolver métodos de purificação desse peptídeo antimicrobiano, para que desta forma, atenda tanto a indústria de alimentos quanto farmacêutica.

Exopolissacarídeos

Algumas bactérias ácido-láticas como *L. lactis* produzem polissacarídeos extracelulares e, portanto são economicamente interessantes, porque podem conferir qualidade aos alimentos e benefícios à saúde. Os polissacarídeos microbianos produzidos comercialmente têm sido aceitos por vários motivos. Alguns são biologicamente similares aos polímeros de eucariotos, como, por exemplo, o ácido hialurônico, que pode, por exemplo, conferir resistência e flexibilidade às cartilagens e tendões e outros são excelentes agentes gelificantes ou suspensores com alta estabilidade em amplo intervalo de pH e temperatura. Por exemplo, a goma xantana é um excelente agente suspensor, enquanto a goma gelana produz géis resistentes e puros, para os quais se tem encontrado uma série de aplicações biotecnológicas. Outros polissacarídeos, incluindo o homopolímero β - D-glucana, possuem atividade biológica como estimulante imunológico ou agente supressor de tumores.

As bactérias ácido-láticas, propionibactérias e bifidobactérias podem sintetizar os exopolissacarídeos, os quais são excretados a partir das células ou podem permanecer ligados à parede celular. No caso dos exopolissacarídeos ligados à superfície celular, estes são denominados "polissacarídeos capsulares". Os exopolissacarídeos podem contribuir para os parâmetros reológicos, conferindo maior estabilidade e textura aos produtos lácteos fermentados com baixo teor de gordura. Além das características tecnológicas atribuídas aos produtos lácteos, os exopolissacarídeos exercem uma série de efeitos benéficos à saúde como, por exemplo, como alimentos funcionais, prebióticos, estimulantes do sistema imunológico, agentes supressores de tumores e na diminuição do colesterol no sangue.

Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas por uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica. A parte apolar é geralmente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto que a polar pode apresentar natureza muito variada, podendo ser uma substância iônica, aniônica ou anfotérica. Devido à presença destes grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na mesma molécula, os surfactantes se posicionam, normalmente, nas interfaces de fluidos com diferentes graus de polaridade (água / óleo ou óleo / água), formando uma película e reduzir a tensão superficial do meio, devido às propriedades únicas dos surfactantes. Estas propriedades fazem dos surfactantes apropriados para um grande número de aplicações industriais, entre as quais se destacam a produção de produtos farmacêuticos devido à capacidade antimicrobiana e de formação de emulsões ou a inibição da adesão de organismos patogênicos às superfícies sólidas, entre outras.

Muitos destes compostos surfactantes são sintetizados por organismos vivos, tais como plantas, micro-organismos, ou o próprio organismo humano, sendo

considerados como surfactantes naturais contra os surfactantes sintéticos obtidos por via química, denominados assim, biossurfactantes. A maioria dos biossurfactantes tem propriedades comuns que são mais eficazes do que surfactantes convencionais. Entre as vantagens dos biossurfactantes obtidos de forma natural destacam-se:

- Menor concentração de biossurfactante necessário para reduzir a tensão superficial.
- Maior tolerância às mudanças de pH, temperatura e força iônica, podendo ser usados em uma ampla gama de condições.
- São biodegradáveis de modo que não causam problemas ao meio ambiente.
- Apresentam toxicidade muito baixa e, portanto, podem ser utilizados com segurança em indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

A principal função destes biossurfactantes no meio é facilitar que determinadas substâncias, que não são miscíveis no solvente no qual se encontram, formem uma emulsão e possam ser acessíveis principalmente àqueles micro-organismos que produzem biossurfactantes.

Os compostos tenso-ativos produzidos por micro-organismos são de dois tipos principais, ou seja, os que reduzem a tensão superficial na interface ar-água (biossurfactantes) e aqueles que reduzem a tensão interfacial entre os líquidos imiscíveis, ou na interface sólido-líquido (bioemulsificantes). Biossurfactantes geralmente apresentam capacidade emulsificante, mas os bioemulsificantes não necessariamente reduzem a tensão superficial.

Consequentemente, biossurfactantes apresentam inúmeras aplicações, destacando-se seu emprego em:

- Aplicações terapêuticas. A indústria farmacêutica é uma de suas aplicações mais importantes. A surfactina, um dos melhores biossurfactantes conhecidos, possui várias aplicações médico-farmacêuticas, como a inibição da formação de coágulos, a formação de canais iônicos em membrana, atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral. Outros usos médicos relevantes dos biossurfactantes incluem o seu papel como agentes anti-adesivos de micro-organismos patogênicos, tornando-os úteis para o tratamento de muitas doenças .

Já foi relatado que um biotensoativo produzido por uma cepa marinha, denominada *B. circulans* tinha uma potente atividade antimicrobiana contra patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos e contra estirpes patogênicas semi-microbianas. Outros pesquisadores já investigaram a atividade antimicrobiana de biossurfactantes de *Bacillus subtilis* R14 contra 29 estirpes de bactérias. Os resultados demonstraram que os lipopeptídios têm um amplo espectro de ação, incluindo atividade antimicrobiana contra micro-organismos com perfis multirresistentes a fármacos.

Vale ressaltar também a inibição da adesão de micro-organismos patogênicos às superfícies sólidas. Assim se encontrou que os biossurfactantes inibem a adesão de micro-organismos patogênicos às superfícies sólidas ou para sítios de infecção. A

aderência prévia de biossurfactantes às superfícies sólidas pode constituir uma nova e eficaz maneira de combater à colonização por micro-organismos patogênicos. Assim, o pré-revestimento de cateteres de vinil uretrais, executando a solução surfactina através deles antes da inoculação com o meio resultou numa redução na quantidade de biopelícula formada por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli* e *Proteus mirabilis*. Além disso, já foi demonstrado que os biossurfactantes reduzem os números microbianos sobre próteses e também induzem um decréscimo na resistência ao fluxo de ar, que ocorre em próteses vocais após a formação de biofilme.

Finalmente, a bioincrustação na cavidade oral frequentemente causa graves problemas. A capacidade de *Streptococcus mutans* para sintetizar glucanos extracelulares a partir da sacarose é vital para o início e progressão da cárie dentária. Recentemente, demonstrou-se que alguns compostos biológicos, tais como metabólitos secundários de bactérias probióticas, têm um efeito anti-incrustação.

Aplicações:

- Produtos de higiene e cosméticos. Devido à sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser empregados em todo tipo de produto de higiene e cosméticos. A obtenção de biossurfactantes por ação enzimática (principalmente lipases) em moléculas hidrofóbicas promoveu uma nova abordagem destes compostos, principalmente para seu uso em produtos deste tipo, isto é, de higiene e de cosméticos.
- Indústria alimentícia. Os biossurfactantes são utilizados para melhorar a reologia de produtos de padaria, já que facilitam a formação de emulsões. Também podem ser empregados para os mesmos fins na indústria de carne. Biossurfactantes são considerados de origem natural de modo a sua utilização na indústria alimentícia é mais bem vista frente aos surfactantes sintéticos. Outro campo, ainda incluído no setor alimentício, em que os biossurfactantes poderiam desempenhar um papel importante, é no desenvolvimento de embalagens ativas que impedissem a adesão de micro-organismos patogênicos em sua superfície, aumentando, assim, a vida útil dos alimentos.
- Biossurfactantes na agricultura. Os biossurfactantes são especialmente empregados na agricultura em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsionantes para dispersá-los em soluções aquosas.
- Biorremediação. Os biossurfactantes permitem reduzir o impacto ambiental causado por diversos resíduos liberados no meio ambiente, como por exemplo, os hidrocarbonetos. Existem vários micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos de cadeia longa como o petróleo, embora estes hidrocarbonetos devam estar biodisponível para eles. A maioria dos hidrocarbonetos causadores de contaminação são altamente insolúveis em água, gerando muitas vezes ligações hidrofóbicas a determinadas superfícies, como rochas, de modo que torna-se muito difícil sua eliminação. Isto ocorre porque os micro-organismos que podem degradá-los não são capazes de acessá-los por não estarem biodisponíveis. Os biossurfactantes atuam produzindo emulsões ou solubilizando os hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, contribuindo assim para sua biodisponibilidade. É por este motivo

que no campo da biorremediação procura-se encontrar micro-organismos produtores de substâncias biossurfactantes que favoreçam a biodisponibilidade destes hidrocarbonetos. Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados tóxicos tais como urânio, cádmio e chumbo. Também é importante ressaltar que os biossurfactantes podem ser obtidos a partir de substratos renováveis, tais como resíduos agroindustriais, reduzindo significativamente o custo de produção dos mesmos.

Além disso, biossurfactantes podem ser utilizados na indústria têxtil, na indústria do papel, de cerâmica e de tinta, entre muitas outras aplicações.

A forma mais rápida de saber se um determinado micro-organismo produz biossurfactante, consiste em medir a tensão superficial do meio de fermentação (caso o biossurfactante seja extracelular) ou fazer uma extração dos biossurfactantes associados à membrana plasmática com PBS (tampão de fosfato e cloreto de sódio) e medir a tensão superficial. A tensão superficial da água destilada é cerca de 72 mN/m, e a adição de biossurfactantes pode baixar a tensão superficial para aproximadamente 26 mN/m. *Pseudomonas aeruginosa* é produtora de um rhamnolípido que reduz a tensão superficial da água para valores de 29 mN/m e a *Pseudomona fluorescens* diminui este valor para 26,5 mN/m, com a produção de um lipopeptídeo (viscosina). Em geral, uma substância é considerada biossurfactante quando é capaz de reduzir a tensão superficial do meio em que se encontra em mais de 8 mN/m.

Existe uma grande variedade de micro-organismos que podem produzir biossurfactantes. Na bibliografia se faz referência tanto às leveduras, como às bactérias e fungos. No entanto, as bactérias são as mais utilizadas para a obtenção destes compostos, devido à sua maior produtividade. Diversos estudos mostram a capacidade das bactérias lácticas para a produção de biossurfactantes. Neste sentido, existem diversos trabalhos relacionados à produção de biossurfactantes por bactérias lácticas focados tanto na caracterização quanto no desenvolvimento de sistemas de produção alternativos que permitam diminuir o custo da produção de biossurfactantes com bactérias lácticas, mediante o emprego de resíduos agroindustriais (avelã e casca de nozes, bagaço de uva e da videira, entre outros) como substratos de fermentação.

Dependendo do metabolismo do micro-organismo, o biossurfactante pode ser obtido extracelularmente ou pode estar associado com a membrana plasmática de diferentes micro-organismos. Neste caso, é necessário realizar um processo de extração, normalmente com PBS (tampão fosfato e NaCl). Além disso, os biossurfactantes podem ser produzidos em diferentes estágios do crescimento celular. Assim, eles podem estar associados com a fase de crescimento exponencial ou na fase estacionária, uma vez que o crescimento das células tenha cessado.

Muitos fatores podem influenciar a produção de biossurfactantes como aeração, pH e a composição do meio de fermentação. Neste último enfatizam a maioria dos trabalhos referindo-se tanto à fonte de carbono como a de minerais e fonte de nitrogênio do mesmo. Atualmente, um dos principais problemas dos biossurfactantes está relacionado com custos de sua produção. Uma alternativa para melhorar a produção biotecnológica de biossurfactantes em nível industrial pode ser através do emprego de substratos renováveis, ou seja, colocando os micro-

organismos produtores de biossurfactantes em contato com a fonte de carbono e nutrientes adequados.

BIBLIOGRAFIA

Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., Converti, A., Oliveira, R. P. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134-142.

Borzani, W., Schimidell, W., Lima, U.A., Aquarone, E. (2001). *Biotecnologia industrial*, São Paulo: Blucher, Volumes 1, 2 e 3.

Brzozowski, B.; Bednarski, W.; Golek, P. (2011). The adhesive capability of two *Lactobacillus* strains and physicochemical properties of their synthesized biosurfactants. *Food Technology and Biotechnology*. V. 49, n. 2, p. 177–186.

Collins, B., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2010). Applications of lactic acid bacteria-produced bacteriocins, in: F. Mozzi, R. R. Raya, G. M. Vignolo (Ed.). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 89-109.

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., & Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564-582.

Drosinos, E. H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M., & Metaxopoulos, J. (2005). Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1314-1323.

Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wrigth, A. (2012). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 4th ed. CRC press. 779 p.

Makkar, R.S. M.; Cameotra, S.S. (1997). Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74, n. 7, p. 887-889.

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., Oliveira, R. P. S. (2013). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, 31, 482–488.

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., Oliveira, R. P. S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 30 70-83.

Manzoni, M. (2006). *Microbiologie industriale*. Editora Casa Editrice Ambrosiana, 410p.

O' Connor, E.B., Barrett, E., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C., Ross, R. P. (2005). In A. Tamime (Eds.). *Production of Vitamins, Exopolysaccharides and Bacteriocins by Probiotic Bacteria: Probiotic Dairy Products* (pp. 169-194). Scotland, United Kingdom.

