

## **PRODUÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE BIOSURFACTANTE POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA (UFPEDA 741) EM MEIO COM GLICEROL E ÓLEO DE SOJA RESIDUAL**

## **PRODUCTION OF EXTRACT BIOSURFACTANT PSEUDOMONAS AERUGINOSA (UFPEDA 741) IN MEDIUM WITH GLYCEROL AND RESIDUAL SOYBEAN OIL**

Lilian Taques de Almeida<sup>1</sup>; Ana Cristina França de Brito<sup>2</sup>; Denise Milléo Almeida<sup>3</sup>; Safi Amaro Monteiro<sup>4</sup>  
<sup>1,2,3,4</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Ponta Grossa – Brasil

[lilialmeida@hotmail.com](mailto:lilialmeida@hotmail.com)

### **Resumo**

*Este trabalho teve como objetivo verificar a produção de extrato bruto de biosurfactante por Pseudomonas aeruginosa (UFPEDA 741) utilizando glicerol e óleo de soja residual proveniente de fritura como fontes de carbono. O experimento foi desenvolvido segundo planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, tendo como variáveis independentes o glicerol e o óleo de soja, e as dependentes a concentração de biomassa, extrato bruto de biosurfactante e tensão superficial. O microrganismo utilizado foi o Pseudomonas aeruginosa (UFPEDA 741) cultivado em 50mL de meio Salino Mineral, sob agitação de 200 rpm a 30°C±2°C por 264h. A maior produção de biomassa foi observado no fermentado contendo glicerol e óleo de fritura, com 0,032 g L<sup>-1</sup>, e 32 g L<sup>-1</sup> de extrato bruto de biosurfactante foi verificado no fermentado com adição de glicerol. O glicerol apresentou efeito significativo sobre a produção de extrato bruto de biosurfactante. O fermentado com adição de glicerol mostrou maior redução, 34,4%, na tensão superficial do meio de cultivo em 192h. O glicerol foi a melhor fonte de carbono na produção de extrato bruto de biosurfactante.*

**Palavras-chave:** biosurfactante; Pseudomonas aeruginosa; glicerol; óleo de soja; tensão superficial.

### **1 Introdução**

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais. A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada através de derivados de petróleo (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Setores que comumente fazem uso de surfactantes são o farmacêutico, alimentício, agrícola, exploração mineral e cosmética (MUKHERJEE et al., 2006), sendo assim, com a preocupação crescente com o meio ambiente se faz necessário buscar alternativas naturais para esta produção (NITSCHKE e PASTORE, 2002), como os surfactantes de origem microbiana, denominados biosurfactantes.

Os biosurfactantes formam um grupo heterogêneo de moléculas que apresentam propriedades tensoativas (GEORGIOU et al., 1992), e suas principais características são baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, produção por meio de substratos renováveis, estáveis em diferentes temperaturas e pH (KOSARIC, 1996).

A dificuldade em otimizar o meio de cultivo e o processo de produção é a chave da viabilidade econômica para a produção de biosurfactantes. Atualmente, estima-se que a matéria-prima representa cerca de 10 a 30% do custo geral da produção de biosurfactante (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

O glicerol é o principal subproduto gerado na produção de biodiesel, sendo que aproximadamente 10 % do volume total de biodiesel produzido corresponde a glicerol (DASARI et al., 2005). Trabalhos recentes têm apontado o uso do glicerol como fonte potencial de carbono para produção de biosurfactante, (MONTEIRO, 2007; SANTA ANNA et al., 2001), além de resíduos agroindustriais (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997).

O aproveitamento de resíduos ou subprodutos é um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias, que buscam a exploração total das matérias-primas e o desenvolvimento de tecnologias limpas. Com o intuito de minimizar o uso dos surfactantes químicos por produtos com baixa ou nenhuma toxicidade, concomitantemente o aproveitamento de resíduos, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de biosurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) utilizando glicerol e óleo de fritura como fonte de carbono.

## 2 Material e Métodos

O microrganismo utilizado no processo de fermentação foi o *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741). O cultivo ocorreu em meio Salino Mineral ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,0 g L<sup>-1</sup>,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7,0 g L<sup>-1</sup>,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g L<sup>-1</sup>, glicerol e/ou óleo de fritura 3,0 g 100 g<sup>-1</sup> e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em tampão fosfato 0,2 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,0) em 50 mL, sob agitação a 200 rpm (Incubadora TE - 420, São Paulo, Brasil). O cultivo foi desenvolvido segundo delineamento experimental fatorial 2<sup>2</sup>, tendo como variáveis independentes o glicerol e óleo de fritura, e as variáveis dependentes a concentração de biosurfactante, biomassa, e tensão superficial do caldo de fermentação (Tabela 1).

Tabela 1 – Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup>

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	Glicerol	Óleo de soja	Biosurfactante g L <sup>-1</sup>	Tensão Superficial Mn m <sup>-1</sup>
1	+	+		
2	+	-		
3	-	+		
4	-	-		

Foram adicionados 2% (v/v) do inóculo ( $10^8$  células/mL) com incubação a  $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  /264 h. As análises foram realizadas em triplicatas nos tempos de 0, 98, 144, 192 e 264 horas.

Para determinar a concentração da biomassa, o caldo de fermentação foi centrifugado a 3900 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para remoção da biomassa, em centrífuga (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil). Para purificação da biomassa foi adicionado água destilada estéril e centrifugado a 3900 rpm por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após, a biomassa foi colocada em placas de Petri e conduzidas a dessecação a  $80^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas até massa constante. O resultado foi expresso em  $\text{g L}^{-1}$  de biomassa.

O teor de biosurfactante foi determinado pelo extrato bruto adaptado de Monteiro (2007). O caldo de fermentação, após retirada a biomassa, foi centrifugado a 3900 rpm por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga (Excelsa 4, modelo 280-R, Fanem – São Paulo, Brasil). O biosurfactante foi dessecado a  $50^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, e os resultados expressos em  $\text{g L}^{-1}$ . A tensão superficial foi determinada pelo método do peso da gota segundo BEHRING et al. (2004) e os resultados expressos em  $\text{mN m}^{-1}$ .

### 3 Resultados e Discussão

#### *Produção de biomassa e extrato bruto de biosurfactante*

Foram observadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) nos valores da concentração de biomassa e de biosurfactantes entre os tratamentos.

Em 96h houve aumento de 7,2% de biomassa, com produção de extrato bruto de biosurfactante de  $14,0 \text{ g L}^{-1}$  no fermentados com adição de glicerol e óleo de fritura, e com apenas glicerol. Após esse período foi observado uma relação inversa entre a produção de extrato bruto de biosurfactante e a produção de biomassa (Figura 1). Porém, segundo Bueno (2008), o crescimento celular é diretamente proporcional à produção de biosurfactante.

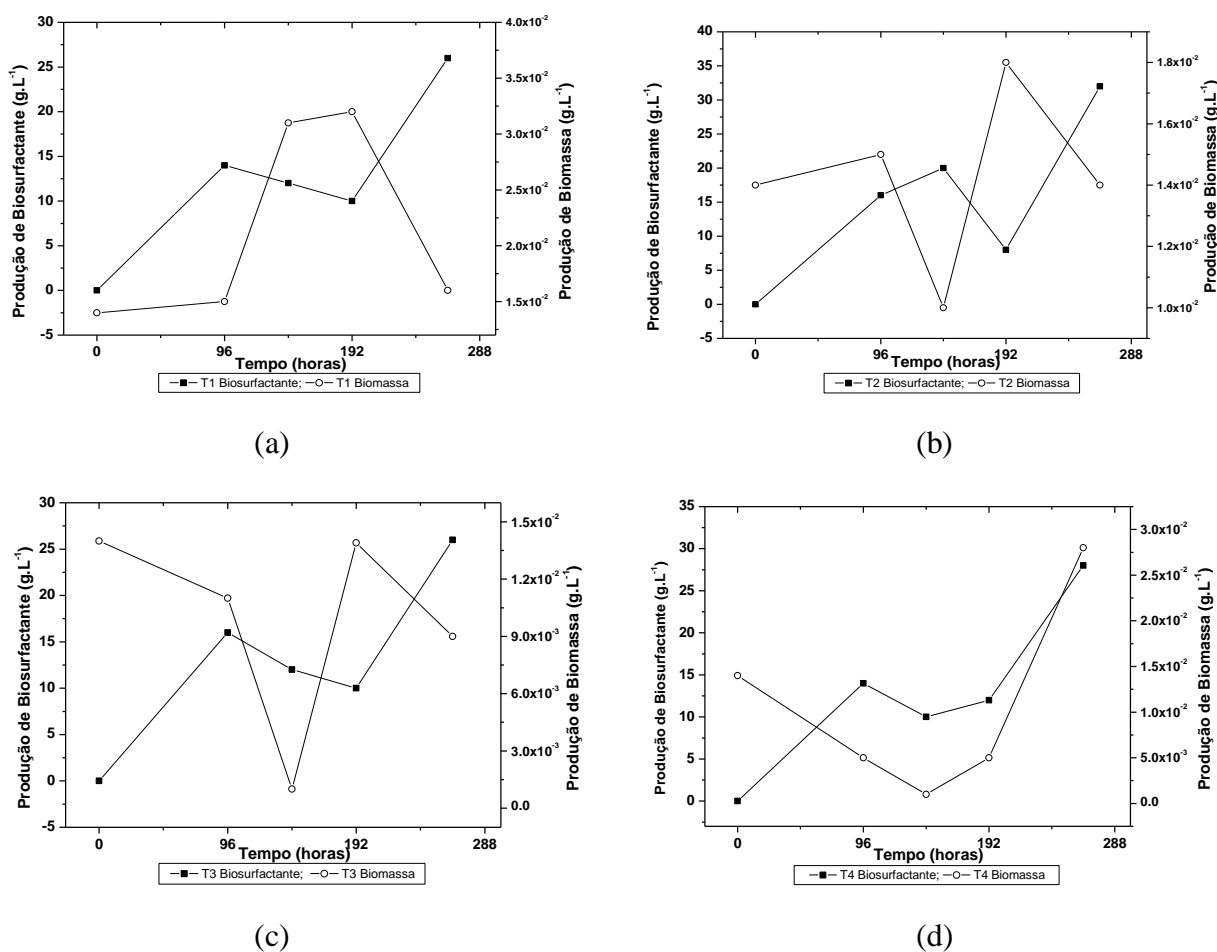
Os fermentados com adição de apenas óleo de fritura apresentaram redução de 28,6% na concentração de biomassa em 96h, e aumento na produção de extrato bruto de biosurfactante. Em 144h ocorreu redução de 92,9% na concentração de biomassa e de 25% na produção de extrato bruto de biosurfactante. Em 192h e 264h a produção de biomassa e de extrato bruto de biosurfactante foi inversamente proporcional (Figura 1).

Os fermentados sem adição de glicerol e óleo de fritura demonstraram declínio de 92,9% na concentração de biomassa até 144h, e posterior aumento de 100% até 264h (Figura 1). Este fato pode ter sido motivado pela baixa concentração de carbono, proveniente apenas do encontrado no

volume de inóculo adicionado ao meio de cultivo. A produção do extrato bruto de biosurfactante teve produção de  $28 \text{ g L}^{-1}$  ao final do período de fermentação.

Entre os fermentados a maior produção de biomassa e extrato bruto de biosurfactante foi verificada nos tratamentos 1 e 2, com  $0,032 \text{ g L}^{-1}$  e  $32 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Santa Anna et al. (2002) observaram aumento na produção de biosurfactante em fermentado, tendo como fonte de carbono o glicerol, com produção de 3 a 4 vezes superior a obtida por outras fontes. Segundo Santana Filho (2009) a melhor produção de ramnolipídeos foi de  $15,0 \text{ g L}^{-1}$  após 7 dias de cultivo, quando foram utilizados  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol.

Figura 1 – Variação da produção de biomassa e biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 741 durante a o processo de fermentação



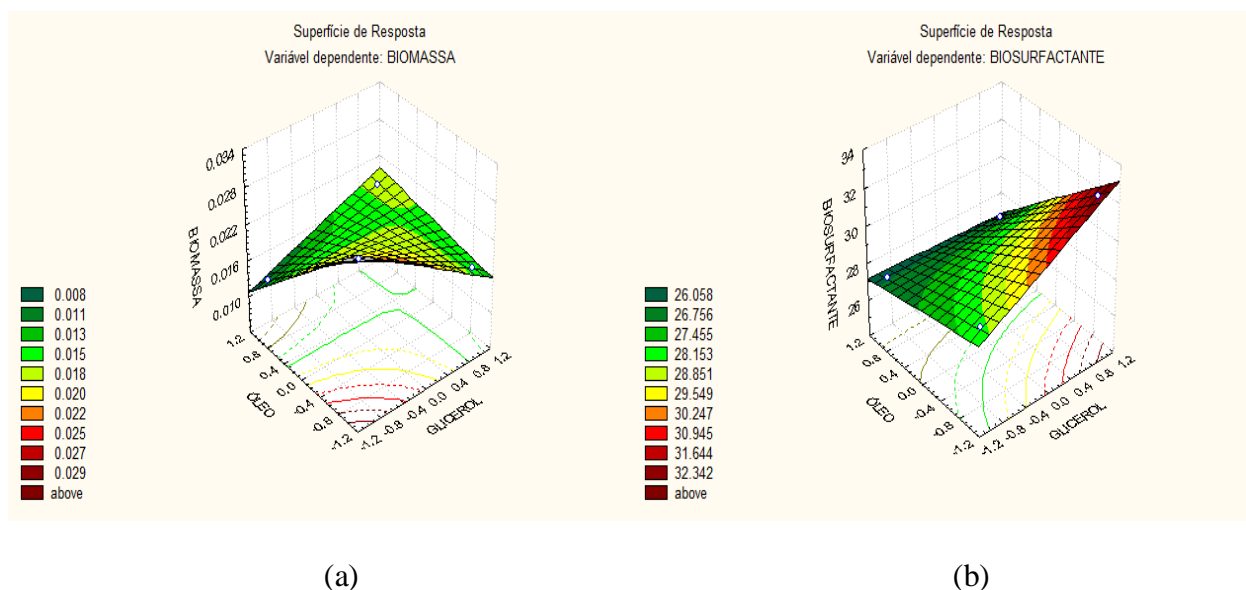
Nota: (a) Tratamento 1; (b) Tratamento 2; (c) Tratamento 3; (d) Tratamento 4.

### *Efeito do glicerol e óleo de fritura na produção de biosurfactante*

A superfície de resposta mostra que o glicerol apresentou efeito significativo sobre a produção de extrato bruto de biosurfactante. A produção de biomassa não foi influenciada

significativamente pelo glicerol e óleo de fritura (Figura 2). Santana Filho (2009) relata que a produção de biosurfactantes é prejudicada pelo efeito difusional causado por excesso de glicerol no meio.

Figura 2 – Superfície de resposta para os efeitos do glicerol e do óleo de fritura na produção de biomassa (a) e extrato bruto de biosurfactante (b)

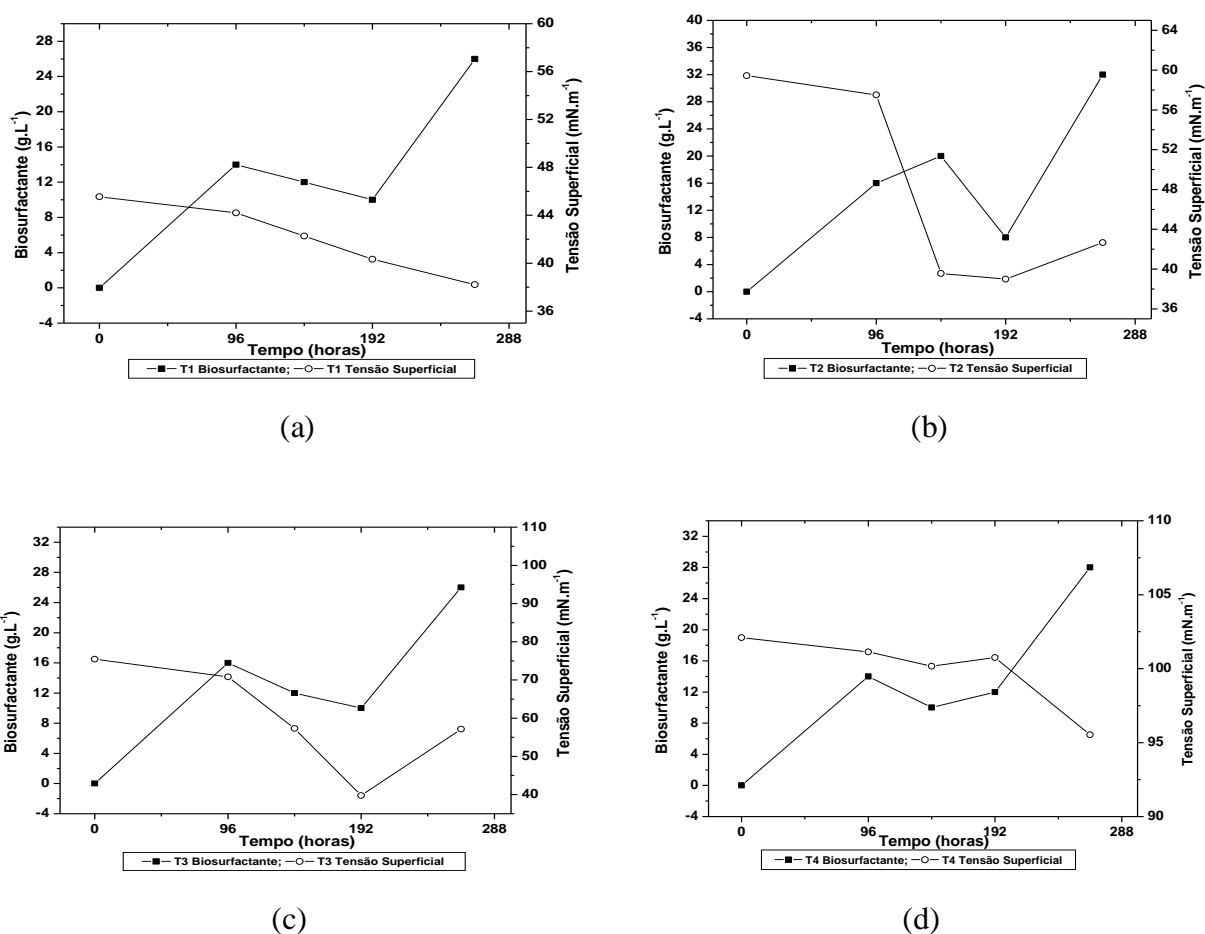


#### *Relação entre a produção de extrato bruto de biosurfactante e a tensão superficial do meio de cultivo*

Durante o período de fermentação houve variações nas concentrações do extrato bruto de biosurfactante e a tensão superficial do meio. Porém, essas variações não tiveram interferência na ação da tensão superficial sobre o caldo de fermentação. De modo geral, com o aumento na concentração do extrato bruto de biosurfactante houve diminuição da tensão superficial do caldo de fermentação (Figura 3, p. 448). Os tratamentos 1, 2, 3 e 4 apresentaram diminuição da tensão superficial em 16,1%, 28,2%, 24,3% e 6,4% ao final do período de fermentação. Entretanto, o fermentado com adição de glicerol mostrou maior redução, 34,4%, na tensão superficial do meio de cultivo em 192h e ao final do período de fermentação.

Em trabalho desenvolvido por Santa Anna et al. (2002) o glicerol foi à melhor fonte de carbono para a produção de raminolípido ( $1,4 \text{ g L}^{-1}$ ) em 10 dias de fermentação, tendo uma queda de tensão superficial de 55% no período de 72h.

Figura 3 – Variação da tensão superficial e a produção de extrato bruto de biosurfactante durante a fermentação de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 741



Nota: (a) Tratamento 1; (b) Tratamento 2; (c) Tratamento 3; (d) Tratamento 4.

## 4 Conclusão

A maior produção de biomassa foi observado no fermentado contendo glicerol e óleo de fritura. O glicerol foi a melhor fonte de carbono com efeito significativo sobre a produção de extrato bruto de biosurfactante e mostrou maior redução na tensão superficial do meio de cultivo em 192h.

## Abstract

*This study aimed to verify the production of crude extract of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) using frying oil and glycerol as carbon sources. The second experiment was conducted 22 experimental design, with independent variables glycerol and frying oil, and the dependent biomass concentration, and biosurfactant crude extract of surface tension. The microorganism used was *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 741) grown in 50mL Saline Mineral medium and shaken at 200 rpm at 30 ° C ± 2 ° C for 264h. The highest biomass production was observed in the fermentation containing glycerol and frying oil, with 0.032 g L<sup>-1</sup>, and 32 g L<sup>-1</sup> of the biosurfactant crude extract was found in fermented with glycerol. The glycerol had a significant effect on the production of the biosurfactant crude extract. Fermented with glycerol showed a*

greater reduction, 34.4%, the surface tension of culture medium in 192h. Glycerol was the best carbon source for the production of crude extract of the biosurfactant.

**Key-words:** biosurfactante; pseudomonas aeruginosa; glycerol; soybean oil; surface tension.

## Referências

BEHRING, J. L.; LUCAS, M. ; MACHADO, C. BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da cmc de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495, 2004. DOI: 10.1590/S0100-40422004000300021

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biosurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. São José do Rio Preto, 2008. Tese. fl.99 Dissertação (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

CAMEOTRA, S. S., MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998. DOI: 10.1007/s002530051329

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G. J. **Applied Catalysis A: General**, v. 5, p. 225,-281, 2005.

GEORGIOU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. “Surface-active compounds from microorganisms”. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65. 1992. DOI: 10.1038/nbt0192-60

KOSARIC, N. **Biosurfactantes**. In: REHM, H.-J.; REED, G. (Eds.). *Biotechnology*, cap. 17. 1996.

MAKKAR, R. S. CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two Bacillus strain at thermophilic condition **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997.

MONTEIRO, S. A. **Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por Pseudomonas aeruginosa** UFPEDA 614. Curitiba, 2007. Dissertação (Doutorado em Química) – Setor de Ciências Exatas – Universidade Federal do Paraná.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.09.005

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002. DOI: 10.1590/S0100-40422002000500013

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR., N.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* pa1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 02, p. 159 - 166, 2002. DOI: 10.1590/S0104-66322002000200011

SANTANA FILHO, A. P. **Ramnolipídeos produzidos por Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614: estudos de produção e de variação da composição de homólogos**. Curitiba, 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) Universidade Federal do Paraná.