

UTILIZAÇÃO DE UM DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

P. F. CORRÊA¹, J. G. M. BRITO¹, H. S. AMORIM¹, B.G. FREITAS¹, R. D. RUFINO^{1,2}, J.M. LUNA^{1,2}, L.A. SARUBBO^{1,2}

¹CCT – Universidade Católica de Pernambuco, Centro de Ciências e Tecnologia

²Centro de Gestão de Tecnologia e Inovação (CGTI)

E-mail para contato: priscilla.correa.pe@gmail.com

RESUMO - Os constantes derramamentos de óleos causados por empresas petrolíferas vêm causando grandes impactos no ambiente. Nesse contexto, os biossurfactantes são produzidos por micro-organismos e destacam-se na remoção de petroderivados em ambientes marinhos e terrestres. O objetivo, portanto, foi produzir um biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* UCP 992, cultivada em 0,5% de milhocina e 4,0% de resíduo de óleo vegetal em biorreator de 1,2 L, empregando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As condições de cultivo foram velocidade de rotação, tempo, aeração e tamanho do inóculo, avaliando-se a redução da tensão superficial e o rendimento. Os melhores resultados foram uma aeração de 0,5 vvm, com 4,0% do inóculo, a 250 rpm e durante 84 horas, resultando em uma tensão superficial de 25,868 mN/m e uma extração de 20,855 g/L de biossurfactante. O DCCR identificou as melhores condições para produção do biossurfactante e apresentou propriedades promissoras da biomolécula para biorremediação

1. Introdução

A necessidade de remediar áreas contaminadas por óleo levou ao desenvolvimento de novas tecnologias de detoxificação destes contaminantes de forma não convencional, ou seja, sem a utilização de métodos somente químicos ou físicos (Fracchia *et al.*, 2012). O uso de micro-organismos ou produtos microbianos para degradar compostos poluentes, é uma destas novas tecnologias (Muthusamy *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2007), conhecida como biorremediação (Calvo *et al.*, 2009).

A biorremediação pode ser definida como um processo de estimulação de situações naturais de biodegradação para limpeza de derramamentos de óleos e tratamento de ambientes terrestres e aquáticos contaminados com compostos xenobióticos (Mukherjee *et al.*, 2006).

Um dos problemas associados a biodegradação de compostos hidrofóbicos, aos quais incluem-se os hidrocarbonetos do petróleo é sua ligação às partículas do solo e a pouca solubilidade em água, resultando em baixa biodisponibilidade para os micro-organismos, o que pode retardar ou até mesmo paralisar o processo de degradação (Satpute *et al.*, 2010).

Nesse sentido, a utilização de compostos surfactantes torna-se uma alternativa atrativa na remoção de contaminantes hidrofóbicos gerados pela indústria de petróleo.

Os surfactantes são compostos anfipáticos que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, apresentando várias aplicações industriais (Burghoff *et al.*, 2012). Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou micro emulsões, ação espumante, solubilidade e detergência, todas ligadas à capacidade de redução da tensão superficial por essas moléculas (Torres *et al.*, 2011).

A grande maioria dos surfactantes disponível comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo (Marchant *et al.*, 2012a). Entretanto, a necessidade de preservação ambiental e as legislações de controle do ambiente têm levado pesquisadores à procura por produtos naturais como alternativas aos produtos existentes. Nesse contexto, destacam-se os surfactantes de origem microbiológica, produzidos principalmente por bactérias e leveduras (Cortis *et al.*, 2007).

Os biosurfactantes incluem uma grande variedade de estruturas químicas tais como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos proteínas-polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros produzidos por micro-organismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos) (Gautam *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos na área de biosurfactantes ocorreram na década de 80 e, desde então, as pesquisas permitiram o desenvolvimento e a comercialização de dois produtos, a Surfactina, uma lipoproteína produzida pela bactéria *Bacillus subtilis* (Al-Bahry *et al.*, 2012) e os Raminolipídeos (Aparna *et al.*, 2012), grupo de glicolipídeos produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e comercializados pela Jeneil Biosurfactants Company (USA). Esses dois biosurfactantes, embora extremamente eficientes, são comercializados a um alto custo em função dos substratos utilizados para suas produções e do nível de pureza exigido para aplicações nas áreas farmacêutica e médica (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2007; Seydlová *et al.*, 2008). Os biosurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de reduzir valores de tensão superficial para 29 mN/m, podendo ser produzidos a partir de vários substratos solúveis e insolúveis (Rufino *et al.*, 2010).

Uma das alternativas para reduzir os custos relacionados aos biosurfactantes consiste na substituição dos substratos comumente utilizados por matérias-primas de baixo custo, como os resíduos industriais (Maneerat *et al.*, 2005). Nesse contexto, as indústrias de petróleo e petroquímica destacam-se como os maiores campos de aplicação dos biosurfactantes, uma vez que utilizam esses compostos em sua forma bruta, ou seja, sem necessidade de purificação, o que representa uma acentuada redução nos custos de aplicação de um agente biotecnológico.

Nos últimos anos, os estudos voltados para a produção de biosurfactantes têm se intensificado em função das características desses compostos como biodegradabilidade, baixa toxicidade, especificidade e estabilidade sob condições ambientais extremas de temperatura, pH e salinidade (Felse *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006).

Nesse sentido, pretende-se utilizar o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) como detector da melhor condição para a produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* na biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

A bactéria *P. aeruginosa* (UCP 0992), depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da UNICAP foi utilizada como micro-organismo produtor do biossurfactante. As culturas foram repicadas a cada 30 dias e mantidas em tubos de ensaio inclinados com o meio sólido Ágar Nutriente (AN) sob refrigeração a 5°C.

2.2 Meios de manutenção e crescimento do inóculo de produção do biossurfactante

Para a manutenção da bactéria foi utilizado o meio Ágar Nutriente com a seguinte composição: extrato de carne (5,0 g), peptona (10,0 g), NaCl (5,0 g), ágar (5,0 g) e água destilada (1000,0 ml). Os constituintes foram solubilizados e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para crescimento do inóculo foi utilizado o meio Caldo Nutritivo (CN) que possui a mesma composição do AN sem a presença do ágar. O meio de produção foi composto com água destilada contendo 0,5 % de milhocina e 4 % de resíduo de borra de refinaria de óleo vegetal (Farias *et al.*, 2007).

2.3 Preparação do inóculo

Culturas jovens da bactéria obtidas após 24 horas de cultivo em meio AN foram transferidas para um Erlenmeyer contendo 50 mL de Caldo Nutritivo que foi mantido sob agitação orbital de 200 rpm durante um período de 14 horas a 28°C para obtenção de uma D.O. de 0,7 (correspondente a um inóculo de 10^7 U.F.C./mL) a 600 nm. Esta leitura foi utilizada como inóculo na concentração de 1% (v/v).

2.4 Produção do biossurfactante utilizando planejamento fatorial

As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas em biorreator de 1,2L. O meio de produção foi submetido à variação das condições de cultivo (velocidade de rotação, tempo de cultivo, aeração e tamanho do inóculo) de acordo com um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) apresentado nas tabelas 01 e 02, à temperatura de 28°C. Ao fim do cultivo, amostras foram centrifugadas e filtradas para determinação da tensão superficial e extração, como parâmetros utilizados para o critério de seleção da melhor condição de produção.

Tabela 1 - Valores das variáveis independentes nos níveis -2, -1, +1 e +2 e no ponto central

Nível	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Tempo de cultivo (horas)	Tamanho do inóculo (%)
-2	175	0	72	1
-1	200	0,5	84	2
0	225	1,0	96	3
+1	250	1,5	108	4
+2	275	2,0	120	5

Tabela 2 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Ensaio	Agitação	Aeração	Tempo de cultivo	Tamanho do inóculo
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1

3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	-2	0	0	0
18	+2	0	0	0
19	0	-2	0	0
20	0	+2	0	0
21	0	0	-2	0
22	0	0	+2	0
23	0	0	0	-2
24	0	0	0	+2
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0

2.5 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi medida no líquido metabólico livre de células em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY.

2.6 Isolamento do biossurfactante

O biossurfactante produzido foi isolado de acordo com a Costa *et al.*, (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Surfactantes são compostos químicos sintéticos derivados do petróleo que possuem porções hidrofílicas e hidrofóbicas (Rufino *et al.*, 2014). Já os biossurfactantes são compostos químicos derivados das características de micro-organismos e são menos agressivos ao meio ambiente (Luna *et al.*, 2013).

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes, apresentando vantagens sobre surfactantes convencionais, como: altas atividades superficiais e interfaciais, tolerância à temperatura pH e força iônica, biodegradabilidade e ainda baixa toxicidade (Rufino *et al.*, 2014).

A tensão superficial é definida como a entalpia superficial livre, por unidade de área, e é a força que atua sobre a superfície de um líquido que conduz a minimização da área superficial (Luna *et al.*, 2011). Desta forma as biossurfactantes podem ser responsáveis pela diminuição da tensão superficial dos líquidos devido à fácil distribuição nas interfaces entre as superfícies com diferentes graus de polaridade, através da formação de micelas (Rufino *et al.*, 2014).

A tabela 03 apresenta os valores das tensões superficiais dos diferentes meios utilizados para a produção do biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 0992). As medidas foram realizadas no líquido metabólico livre de células para cada condição específica, de acordo com um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Tabela 03- Tensões superficiais e extrações de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 0992) utilizando diferentes condições de cultivo

Condições	Tensão superficial (mN/m)	Extração (g/L)
1	27,989	3,788
2	27,273	5,648
3	26,226	9,847
4	28,848	9,876
5	27,126	7,328
6	27,555	14,424
7	26,038	9,670
8	26,594	18,760
9	29,546	6,090
10	25,868	20,855
11	26,153	18,386
12	26,366	12,50
13	26,397	20,170
17	26,868	10,270
19	25,949	17,523
21	28,009	4,018

A condição 10 do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) apresentou melhores resultados em relação às demais condições avaliadas. A condição selecionada apresentou as seguintes condições: inóculo de 4%, cultivo durante 84 horas, aeração de 0,5 vvm e uma agitação de 250 rpm. A tensão superficial apresentou um valor de 25,868 mN/m com uma extração de 20,855 g/L. O maior rendimento obtido na condição aqui especificada pode estar relacionado ao fato de a bactéria *P. aeruginosa* ser um micro-organismo facultativo que pode apresentar crescimento em ambientes com baixa concentração de oxigênio (Silva *et al.*, 2010). Os demais experimentos apresentaram resultados favoráveis em relação a menores valores de tensão superficial, mas a seleção da melhor condição de cultivo deverá ser realizada após a conclusão de todos os experimentos e a elaboração de superfícies de resposta contendo os dados obtidos.

Os resultados obtidos são comparáveis aos observados por Silva *et al.* (2010), onde o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* cultivada em meio contendo 3 % de glicerol apresentou uma tensão superficial de 27,6 mN/m com uma extração de 6,5 g/L. Silva *et al.* (2013), constatou também que a *P. cepacia* cultivada em meio de 2% de óleo residual de fritura e 3% de milhocina produziu um biossurfactante que apresentou uma tensão superficial de 26 mN/m com uma extração de 8 g/L.

Aparna *et al.* (2012), observaram que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas* sp 2B cultivada em meio contendo 1 % de melaço apresentou tensão superficial de 30,14 mN/m com uma extração de 4,97 g/L. Em estudos realizados por Oliveira *et al.* (2009), o biopolímero produzido por *P. alcaligenes* PCL cultivada em meio suplementado com sais minerais e óleo de palma, apresentou uma redução na tensão superficial do meio para 28

mN/m com uma extração de 2,3 g/L. Em outro estudo Monteiro *et al.* (2007), constataram que o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* DAUPE 614 cultivada em meio contendo glicerol e nitrato de amônia apresentou tensão superficial de 27,3 mN/m com uma extração de 3,9 g/L.

Sendo assim, pode-se observar que a maioria dos trabalhos realizados com a bactéria *Pseudomonas* apresentam resultados satisfatórios para a produção de biossurfactantes potentes, em relação à redução das tensões superficiais dos meios de cultivo. Mas a extração observada no presente trabalho foi bem superior aos obtidos nos demais estudos. Assim, o biopolímero obtido nas condições aqui especificadas, torna-se um agente promissor para utilização em experimentos futuros de avaliação de suas características emulsionantes e dispersantes, para que dessa forma sejam avaliadas possibilidades de utilização do bioproduto em ambientes contaminados com petróleo e derivados.

4. CONCLUSÃO

Os biossurfactantes podem ser utilizados em substituição aos surfactantes sintéticos, pois não agredem o meio ambiente; entretanto, a produção dessas biomoléculas em grande escala ainda é cara. Desta forma, estão sendo realizados estudos que utilizam meios de produção de baixo custos que permitam a produção de biossurfactantes com características muito próximas às dos surfactantes sintéticos.

A *Pseudomonas aeruginosa*, (UCP 0992) na presença de milhocina e borra de óleo vegetal, produz um biocomposto com a propriedade surfactante tensão superficial ótima para uma biorremediação. As tensões superficiais foram muito próximas e em algumas condições a extração foi excelente; contudo, ainda é necessário fazer mais fermentações para obter a melhor condição com uma tensão superficial baixa e uma alta extração.

5. REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A M; LÉPINE, F; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86, n. 5, p.1323-1336, 2010.
- AL-BAHRY, S.N.; AL-WAHAIBI, Y.M.; ELSHAFIE, A.E.; AL-BEMANI, A.S.; JOSHI, S.J.; AL-MAKHMARI, H.S.; AL-SULAIMANI, H.S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**. doi:10.1016/j.ibiod.2012.01.0062012, 2012.
- APARNA, A.; SRINIKETHANA, G.; SMITHAB, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.043, 2012.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, M. G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 01-14, 2007.
- BURGHOFF, B. Foam fractionation applications. **Journal of Biotechnology**, v. 161, p. 126-

137, 2012.

CALVO, C et al. APPLICATION OF BIOEMULSIFIERS IN SOIL BIOREMEDIATION PROCESSES: FUTURE PROSPECTS. **Science Of The Total Environment**, v. 407, n. , p.3634-3640, 2009.

CORTIS, A.; GHEZZEHEI, T. A. On the transport of emulsions in porous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 1-4, 2007.

FELSE, P. A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K. J.; GROSS, R. A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; GIOVANNA MARTINOTTI; M., BANAT, I.M. **Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – Present Status and Future Potentials**, Biomedical Science, Engineering and Technology, Dhanjoo N. Ghista (Ed.), pp. 325-370, 2012.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, p. 155-166, 2006.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; ALBUQUERQUE, C.D.C; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 12, p. 2463-2476, 2011.

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

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, v. 34, p. 1597-1605, 2012a

MONTEIRO S. A.; SASSAKI G. L., SOUZA L. M. DE; MEIRA J. A.; ARAUJO J. M. DE; MITCHELL D. A.; RAMOS L. P.; KRIEGER N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, V. 147, p. 1-13, 2007.

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

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-747, 2008.

OLIVEIRA, F.J.S; VAZQUEZ L.; DE CAMPOS N.P.; DE FRANÇA F.P. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 383–389, 2009

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI G. M. Enhancement of stability of

biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 729-734, 2007.

RUFINO, R. D. Produção otimizada do Biossurfactante Rufisan por *Candida lipolytica* e aplicações biotecnológicas. **Tese de doutorado – Universidade Federal de Pernambuco**. P. 159, 2014.

SATPUTE, S K et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. , p.436-458, 2010.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications, **Central European Journal of Medicine**, v. 2, p. 123-133, 2008.

SILVA, S.N.R.L., FARIAS, C.B.B., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**. , v.79, p.174 - 183, 2010.

SILVA, S.N.R.L., RUFINO, R.D., LUNA, J.M, FARIAS, C.B.B., SANTOS, V. A., FILHO, H.J.B.L., SARUBBO, L.A. Enhancement of Biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 Through Optimisation of Nutritional Parameters Using Response Surface Methodology. **Revista Tenside Surfactants Detergents**. v. 50, nº2, p. 137-142, 2013.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.

TORRES, L.; MOCTEZUMA A.; AVENDAÑO, J.R.; MUÑOZ, A.; GRACIDA, J. Comparison of bio- and synthetic surfactants for EOR. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 76 p. 6–11, 2011