



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE RAMNOLIPÍDEO PRODUZIDO POR *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

J. M. D. A. CÂMARA¹, M. A. S. B. SOUSA¹, E. L. B. NETO¹ e G. P. MAFRA¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química
E-mail para contato: jessicacamara.eq@gmail.com

RESUMO – *Surfactantes são moléculas com propriedades anfífilas e facilitam a emulsão de hidrocarbonetos em água. Os sintéticos são comumente tóxicos e causam danos ambientais devido à sua baixa biodegradabilidade. Os biossurfactantes, moléculas produzidas por microrganismos, são uma alternativa aos surfactantes químicos. Ramnolipídeos são conhecidos por serem produzidos por espécies de bactérias Pseudomonas e pelo alto rendimento produtivo. Neste trabalho, a produção do ramnolipídeo pela P. aeruginosa, utilizando como substrato o glicerol, foi investigada e otimizada. Para avaliar as melhores respostas, utilizou-se um planejamento fatorial completo 2⁴, investigando a influência do pH, temperatura, concentração inicial de glicerol e tempo de cultivo. Os resultados mostraram que o uso de microrganismos com capacidade de biodegradação forneceu uma estratégia eficiente para produção de biossurfactante e todos os fatores testados apresentaram efeito significativo na produção do metabólito.*

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são uma importante classe de compostos químicos usados em diferentes campos (VAZ *et al.*, 2012). Eles são compostos anfífilos que podem reduzir a energia livre de sistemas substituindo moléculas de alta energia na interface (PARIA, 2008). Esta propriedade anfífilica reduz a tensão superficial e facilita a emulsificação de hidrocarbonetos (CAMPOS-TAKAKI *et al.*, 2010).

Devido a sua capacidade de formação de espumas e seu poder de ação como detergente, os surfactantes são extremamente usados nas indústrias, incluindo a indústria petroquímica (AL-SABAGH *et al.*, 2003 e farmacêuticas (CHRISTIANSEN *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Porém, nos últimos anos, o aumento da consciência ambiental levou a um aumento de interesse na utilização de surfactantes com base renovável e biodegradável (GRAND VIEW RESEARCH, 2014). Diante disso, os biossurfactantes, produzidos por diversos grupos de organismos, passaram a ser usados como uma alternativa aos surfactantes (HENKEL *et al.*, 2012).

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



Quando comparados com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes tem ganhado mais atenção devido as suas características. Dentre essas propriedades podem ser citadas: alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixo custo, aceitabilidade ecológica, seletividade, e alta atividade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (DAS; MUKHERJEE, 2007).

Os ramnolipídeos têm sido extensivamente investigados na literatura (ABDEL-MAWGOUD *et al.*, 2010). Eles são comumente conhecidos por serem produzidos por espécies de *Pseudomonas* quando estas crescem em diferentes substratos (RIKALOVIC *et al.*, 2012). Este biossurfactante está entre os mais efetivos devido ao seu baixo valor de tensão superficial mínimo (28-30 mN/m), alta atividade emulsificante e baixo CMC (10-200 mg/L) (ABBASI *et al.*, 2012).

Em razão disso, este estudo utilizou um planejamento fatorial completo 2^4 com o objetivo de otimizar a produção do biossurfactante ramnolipídeo, produzido através de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Meios e Condições

Para a produção do ramnolipídeo por uma cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizou-se como meio líquido o meio mineral descrito por Robert *et al.* (1989). Após ajuste de pH para 7,0, quando necessário, o meio de cultivo foi esterilizado. Como pré-inóculo, foi utilizada uma solução nutriente de peptona 2% em massa, onde permaneceram no shaker em agitação de 200 rpm e 30 °C durante 24 horas (MIGUEZ *et al.*, 2012). Como fonte de carbono foi utilizada a glicerina.

2.2. Otimização da Produção de Ramnolipídeo

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi aplicado para otimizar a produção de ramnolipídeo pela *Pseudomonas aeruginosa*. Este tipo de design é importante para avaliar quantitativamente a influencia de variáveis significativas sobre a resposta de interesse, bem como as possíveis interações de uns fatores com os outros (CAROLINA; COSTA, 2011). Quatro fatores independentes foram incluídos no planejamento. Uma variável que afetava a composição do meio, a concentração da fonte de carbono, e três variáveis que afetavam a condição fisiológica, o pH, a temperatura e o tempo de cultivo. Para cada fator, um nível alto (+) e um baixo (-) foram testados, os quais podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Range experimental e níveis das variáveis independentes do planejamento completo 2^4

Variável	Símbolo	Unidade	Nível		
			Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
Temperatura	T	°C	30	36.5	42
C. substrato	C	% (v/v)	1	5	10
Tempo	tem	dias	3	5	7
pH	pH	pH	5	6.5	8

O design experimental foi formado por 16 corridas de várias combinações dos níveis de cada variável testada, e mais 3 corridas nas condições centrais, aplicadas de acordo com a matriz de design da Tabela 2.

Tabela 2 – Matriz de design com o valor codificado das variáveis independentes e o valor da concentração de ramnolipídeo

Corridas	Temperatura (°C)	Concentração	Tempo (dias)	pH	Concentração Ramnolipídeo (g/L)
1	-	-	-	-	0,222
2	+	-	-	-	0,170
3	-	+	-	-	0,404
4	+	+	-	-	0,316
5	-	-	+	-	0,287
6	+	-	+	-	0,229
7	-	+	+	-	0,606
8	+	+	+	-	0,444
9	-	-	-	+	0,283
10	+	-	-	+	0,193
11	-	+	-	+	0,737
12	+	+	-	+	0,452
13	-	-	+	+	0,324
14	+	-	+	+	0,248
15	-	+	+	+	1,285
16	+	+	+	+	1,116
17	0	0	0	0	0,471
18	0	0	0	0	0,449
19	0	0	0	0	0,498

2.3. Determinação Analítica do Ramnolipídeo

A concentração de ramnolipídeo foi determinada colorimetricamente como ramnose usando o método de Dubois *et al.* (1956) e ilustrado por Prieto *et al.* (2008). Um volume de 0,5 mL do sobrenadante foi misturado com 0,5 mL de uma solução de 5% m/v de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico, e encubado por 15 minutos antes de ter sua absorbância medida a um comprimento de onda de 490 nm.

2.4. Análises Estatísticas

As análises estatísticas e as representações gráficas dos experimentos foram realizadas

utilizando o software Statistica® (versão 7.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos desse experimento foram estatisticamente avaliados usando a análise de variância (ANOVA; Tabela 3). Também foi observado que um modelo de primeira ordem que considera as interações de primeira ordem descreve bem a produção de ramnolípídeo (C.R).

Tabela 3 – ANOVA para o planejamento experimental completo 2^4

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº de Graus de Liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	1,5654	10	0,1565	21,02 ^a
Resíduos	0,0596	8	0,0074	
Falta de ajuste	0,0584	6	0,0097	16,15 ^b
Erro puro	0,0012	2	0,0006	
Total	1,6250	18		

^a $F_{10;8;0.05}=3.35$ ^b $F_{6;2;0.05}=19.33$

O baixo erro puro relativo indica uma boa reprodutibilidade dos experimentos. Baseado no teste F, o modelo encontrado é preditivo, uma vez que o valor de F, calculado pela razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos, foi maior do que o valor de F crítico e o coeficiente de regressão (0,964) foi próximo da unidade. Isso também pode ser verificado pela Figura 1. Também foi usado o teste F da razão entre a média quadrática da falta de ajuste e a média quadrática do erro puro para avaliar se o modelo está bem ajustado às observações. Para que não haja evidências de falta de ajuste do modelo, o valor desta razão deve ser menor do que o valor do ponto da distribuição F tabelado.

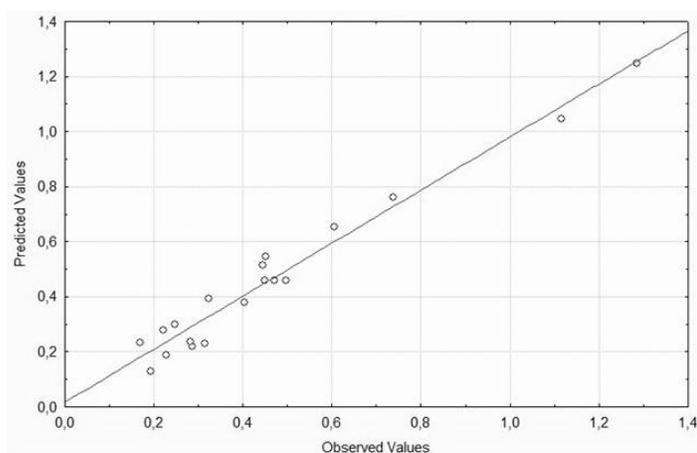


Figura 1 – Valores observados versus valores preditos.

Para estudar os efeitos das variáveis na produção de ramnolípídeo, foi usado o modelo

codificado (Equação 1) para gerar as superfícies de resposta.

$$C.R = 0,460 - 0,123 * T + 0,426 * C + 0,220 * tem + 0,245 * pH - 0,054 * T * C + 0,165 * C * tem + 0,210 * C * pH + 0,107 * tem * pH \quad (1)$$

Através do diagrama de Pareto (Figura 2), é possível observar de forma mais nítida o efeito das variáveis independentes na produção do biossurfactante.

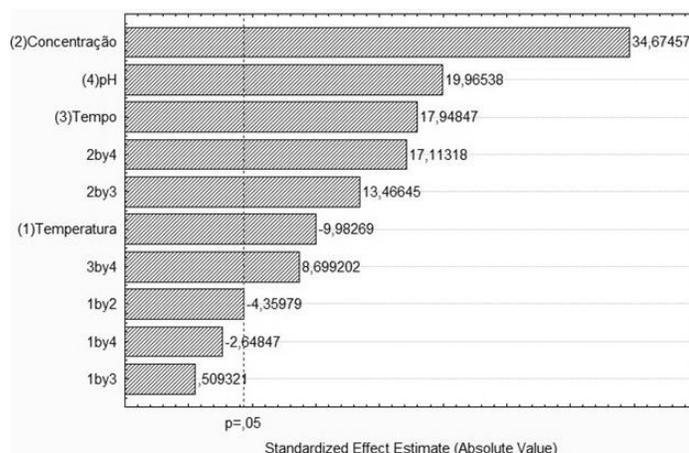


Figura 2 – Diagrama de Pareto padronizado para a estimativa dos efeitos.

O efeito negativo provocado pelo contraste da temperatura mostra que quanto menor a temperatura (30°C), maior será a influência na síntese do metabólito em estudo. Os demais fatores, como concentração do substrato, tempo de cultivo e pH, apresentaram um efeito positivo, indicando que quanto maior o seu valor, maior é a produção do ramnolípido. Além disso, apenas as interações entre a temperatura e o pH e a temperatura e o tempo de cultivo não apresentaram efeito significativo na síntese do produto.

No trabalho desenvolvido por Wei *et al.* (2005), a temperatura também não foi um fator preponderante nas sínteses de ramnolípdeos por *Pseudomonas aeruginosas*, entretanto, a produção ótima também foi atingida nos níveis mais baixos. Este comportamento também foi observado ao utilizar como substrato o resíduo agroindustrial manipueira (BEZERRA *et al.*, 2012) e no trabalho de Hassan *et al.* (2015), que também utilizou como substrato a glicerina.

O efeito positivo pela variação da concentração inicial também foi observado nos trabalhos de Pereira *et al.* (2013), ao utilizar o glicerol bruto como substrato, e no de Reis *et al.* (2010), que utilizou o glicerol comercial. A relação entre a temperatura e a concentração com a produção do biossurfactante pode ser observada na Figura 2, através da superfície de resposta.

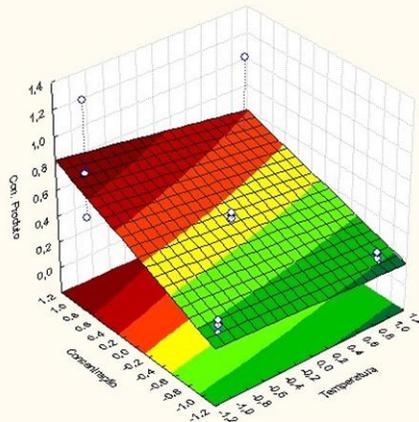


Figura 3 – Superfície de resposta em razão da concentração do substrato e da temperatura.

Hassan *et al.* (2015) em seu trabalho também verificaram um efeito positivo do pH na produção do ramnolipídeo, obtendo a mais alta produção com um pH igual a 8. Desta forma, a Figura 4 mostra a interação entre o pH e o tempo de cultivo, evidenciando que ambas as variáveis favorecem a formação do biosurfactante quando estão no seu nível mais alto.

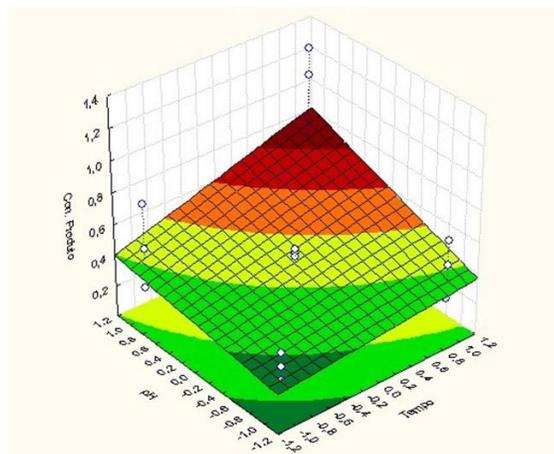


Figura 4 – Superfície de resposta em razão do pH e do tempo de cultivo.

A mais alta produção de ramnolipídeo foi atingida com baixa temperatura (30°C), alto pH (8), alta concentração do substrato (10%) e maior tempo de cultivo (7 dias).

4. CONCLUSÃO

O planejamento fatorial completo 2^4 aplicado determinou que a concentração inicial do substrato é o efeito mais significativo na produção do ramnolipídeo pela *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a temperatura o fator menos significante. Porém, todos os fatores estudados mostraram um efeito expressivo na geração do metabólito estudado.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

Desta maneira, os resultados evidenciaram a eficiência do planejamento experimental em determinar os fatores significantes e em definir as condições ótimas para a máxima produção do biosurfactante. De acordo com os dados obtidos, a combinação da temperatura no menor nível e dos demais fatores (pH, tempo de cultivo e concentração do substrato) nos maiores níveis mostraram ser as melhores condições ao usar o glicerol como fonte de carbono.

5. REFERÊNCIAS

ABBASI, H. *et al.* Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 113, n. 2, p. 211–219, 2012.

AL-SABAGH, A. M. *et al.* Synthesis and evaluation of some polymeric surfactants for treating crude oil emulsions: Part I: Treatment of sandy soil polluted with crude oil by monomeric and polymeric surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 216, p. 9–19, 2003.

BEZERRA, M. S. *et al.* Produção de biotensioativo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (p.a.) e resíduo agroindustrial (manipueira) como substrato. *HOLOS*, v. 1, p. 14–27, 2012.

CAROLINA, M.; COSTA, B. A importância do ensino da ferramenta de engenharia. Congresso Brasileiro de Educação em Engenharia. *Anais...* Blumenau: 2011

CHRISTIANSEN, A. *et al.* Effects of non-ionic surfactants on cytochrome P450-mediated metabolism in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 78, n. 1, p. 166–172, 2011.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 8, p. 1191–1199, 2007.

GRAND VIEW RESEARCH. *Biosurfactants market by product (rhamnolipids, sophorolipids, MES, APG, sorbitan esters, sucrose esters) expected to reach USD 2308.8 Million by 2020*, 2014.

HASSAN, M. *et al.* Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–Burman design. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p. 573–579, 2016.

MIGUEZ, M. *et al.* Selection of yeasts for the production of L-phenyl acetyl carbinol. *Chemical Engineering Transactions*, v. 27, p. 163–168, 2012.

NOGUEIRA, D. R. *et al.* Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics*, v. 420, n. 1, p. 51–8, 2011.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 138, n. 1, p. 24–58, 2008.

PEREIRA, A. G. *et al.* Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 48, n. 9, p. 1271–1278, 2013.

PRIETO, L. M. *et al.* The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. *Chemosphere*, v. 71, n. 9, p. 1781–1785, 2008.

REIS, R. S. *et al.* Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 9, p. 1504–1510, 2010.

RIKALOVIC, M. *et al.* Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 77, n. 1, p. 27–42, 2012.

ROBERT, M. *et al.* Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett*, v. 11, p. 871–874, 1989.

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.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 2, p. 146–154, 2005.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO

