

O UTILIZAÇÃO DE GLICEROL NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Nayara Barbosa¹; Lucas Albuquerque²
¹UFPB, nayarabs94@hotmail.com
²UFPB, lucasaalbuquer@hotmail.com

Introdução

Os surfactantes são compostos anfífilicos constituídos por uma porção hidrofóbica e um grupo hidrofílico (BUENO; SILVA; CRUZ, 2010). Por substituírem a maior parte das moléculas de alta energia nas interfaces, são caracterizados como agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema e a tensão superficial e interfacial dos líquidos; Industrialmente são substâncias com ampla utilização nos setores da agricultura, alimentos, cosméticos e fármacos (MOUAFI; ELSOUD; MOHARAM, 2016). Apesar disso, os surfactantes comercializados são sintetizados a partir de derivados do petróleo o que tem sido alarmante para o meio ambiente. Visando a diminuição do impacto ambiental e em paralelo com novas legislações de controle do meio ambiente, aumenta então, a busca por surfactantes biológicos em decorrência de serem biodegradáveis (BUENO; SILVA; CRUZ, 2010). Os biossurfactantes são produzidos por microrganismos, plantas e animais, incluindo os seres humanos. Estes têm sido o foco de diversas pesquisas por apresentarem vantagens tais como menor toxicidade, compatibilidade ambiental, biodegradabilidade e síntese a partir de matérias-primas renováveis, quando comparados com os surfactantes químicos (AL-WAHAIBI et al., 2014). No entanto, devido a atual indisponibilidade dos biossurfactantes em escala comercial, aplicações de métodos de otimização estatísticos ou a utilização de matéria-prima de baixo custo como subprodutos agroindustriais, têm sido estudados (AL-WAHAIBI et al., 2014). Por representarem uma redução de 10 a 50% nos custos de produção dos biossurfactantes, a escolha de uma matéria-prima é de extrema importância para a economia total do processo (FARIA, 2010). Nesse sentido, os resíduos agroindustriais utilizados como substrato orgânico para fermentações industriais possuem vantagens de serem encontradas em excesso e produzidas em regiões de clima tropical ou temperado. Devido ao aumento da demanda de produção de biodiesel, o glicerol tem ganhado atenção no cenário de bioprocessos, demonstrando ser útil para produção de biomoléculas de interesse para a indústria. Para obtenção de grande quantidade de biossurfactante é de fundamental importância a escolha do microrganismo e o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo. Este que sofre influência de fatores como fontes de carbono e nitrogênio, presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio além de pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo (FONTES et al., 2008). As bactérias, juntamente com as arqueobactérias, são os maiores responsáveis pela produção desses tensoativos; A fim de avaliar a viabilidade desses compostos para processos industriais, pesquisas frente a condições extremas de temperatura, pressão, força iônica, pH e presença de solventes orgânicos, têm sido desenvolvidas. Estudos prévios têm demonstrado haver significativa estabilidade dos biossurfactantes mesmo quando comparados a compostos sintéticos (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

Metodologia

O microrganismo utilizado foi a *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria isolada do solo próxima a um posto de combustíveis da região metropolitana de João Pessoa-PB. A cultura foi mantida em meio sólido inclinado e em placas com meio Luria-Bertani: Ágar (20g/L), Peptona (10g/L), Extrato de levedura (5g/L), Cloreto de sódio (10g/L). A renovação das células feita a cada dois meses por repique no meio e incubação a 30°C durante 24 horas mantidas posteriormente a 4°C. Foram realizados processos simultâneos e em duplicatas de duas concentrações diferentes de substrato – glicerol PA (20g/L e 40g/L) sob as condições de 30°C e 200 rpm por 72 horas em mesa agitadora. Para cada replicata foram preparados em Erlenmeyer de 500 mL, 250 mL de meio de cultivo proposto por Santa Anna (2001): KH₂PO₄ (3 g/L); K₂HPO₄ (7 g/L); (NH₄)₂SO₄ (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,2 g/L); glicerol (20g/L ou 40g/L), e esterilizado por 15 min, 1 atm e 111°C. Deste, foram reservados em um Erlenmeyer de 50 mL, o volume de 25 mL para o pré-inoculo que foi preparado colocando 1mL da cepa solubilizada em 5mL água destilada estéril. Após incubação por 24 horas nas mesmas condições de processo, foi realizado o inoculo deste vertendo-o nos 225mL restante de meio de cultivo. Em seguida prosseguiu-se com a incubação por mais 72 horas. No momento do inoculo e ao término do processo foram retiradas amostras para análise de pH, índice de emulsificação e tensão superficial. Durante o processo foram retirados também, em tempos pré-estabelecidos, amostras para análise de crescimento celular. Os ensaios foram realizados com a finalidade de acompanhar a produção de biosurfactante com concentrações diferentes de substrato sob condição fixa de processo.

Resultados e discussão

Nos instantes inicial (zero hora após o inoculo) e final (72 horas de produção), foram realizadas em duplicatas as análises de tensão superficial, índice de emulsificação, pH e biomassa. A tensão superficial, uma medida indireta da produção de biosurfactantes, foi determinada no meio livre de células utilizando um Tensiômetro a 25 °C. Como se era esperado com base na literatura, constatou-se o decaimento da tensão para ambas as concentrações de glicerol. Contudo, observou-se que para a concentração de 40g/L o decaimento da tensão superficial durante o período de produção, foi mais significativo de 66,05 mN/m para 34,3 mN/m enquanto que para a concentração de 20g/L a média registrada foi de 54,9 mN/m para 32,7 mN/m. Decesaro et al (2013), verificou a diminuição da tensão superficial do meio no decorrer do tempo de fermentação para as duas bactérias estudadas, o que indica a produção de compostos tensoativos no meio de cultivo, em seu artigo a maior redução por pseudomonas foi de 20% de 50,33 mN/m para 39,83 mN/m.

A análise do índice de emulsificação ocorreu através da agitação em vórtex de 2 mL do meio de cultura acrescidos de 2 mL de óleo de soja por 2 minutos com leitura somente após 24 horas. Representado pela razão:

$$IE(\%) = (H_{fe} / H_{total}) \times 100$$

Onde: H_{fe} - Altura da fase emulsionada

H_{total} - Altura total da total de líquido

Constatou-se, durante as 72 horas de produção, o aumento da emulsão para ambas as concentrações de substrato. Principalmente para a concentração de glicerol 20g/L na qual a média foi de 35,52 a 93,54 enquanto que para a concentração de 40g/L a média registrada foi de 41,73 para 91,28. Com o auxílio de um peagâmetro, observou-se uma leve acidificação do meio que permaneceu em média de 7 e 6,61 no início e término do processo respectivamente

para ambas as concentrações. Para a construção da curva padrão de crescimento celular (curva de calibração que correlaciona a absorvância do meio com uma concentração celular em g/L), utilizou-se o método de turbidimetria onde a concentração de biomassa foi mensurada a um comprimento de onda de 600nm em tempos pré determinados. Apesar de discreto, o crescimento celular mais significativo durante o período de produção foi o de concentração de substrato 40 g/L.

Conclusões

Foi avaliada a utilização do resíduo da produção de biodiesel, o glicerol, como substrato na produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* sob as condições de processo de 30°C e 200 rpm por 72 horas em mesa agitadora. Nele foram realizadas avaliações em duplicatas de parâmetros como tensão superficial, índice de emulsificação, pH e biomassa a fim de acompanhar a produção do biossurfactante nessas condições em duas concentrações diferentes de substrato 20g/L e 40g/L. Para estas observou-se similaridades porém maior efetividade na diminuição da tensão superficial e crescimento celular para a concentração de glicerol 40g/L.

Palavras-Chave: Biossurfactantes; *Pseudomonas aeruginosa*; Glicerol.

Referências

MILLER, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar Analytical Chemistry 1959 31 (3), 426-428, 1959.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2006.

SANTA ANNA, L. M, G. V. SEBASTIAN, N. PEREIRA, JR., T. L. M. ALVES, E. P. MENEZES, D. M. G. FREIRE. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Applied biochemistry and biotechnology, v. 91, n. 1-9, p. 459-467, 2001. SCHMIDELL, W.; LIMAS. U. A.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial, São Paulo, Blucher, v. 2, p.93-114, 2001

VASONCELOS, N.M. D. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: Histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Fortaleza. Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

Andressa Decesarol¹; Magali Rejane Rigon¹; Antônio Thomé^{II}; Luciane Maria Colla^{II}, Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel;¹Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Campus I, BR 285, km 171, CP 611, 99001-970 Passo Fundo - RS, Brasil
^{II}Universidade de Passo Fundo, Campus I, BR 285, km 171, CP 611, 99001-970 Passo Fundo - RS, Brasil

