



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE**

**Guilherme Borges Coelho**

Uberlândia – MG

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**



## **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE**

**GUILHERME BORGES COELHO**

Monografia de graduação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Engenharia Química

Uberlândia – MG

2018

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA MONOGRAFIA DA DISCIPLINA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE **GUILHERME BORGES COELHO**  
APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, EM **15 DE**  
**JANEIRO DE 2019.**

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Vicelma Luíz Cardoso  
Orientador (FEQ/UFU)

---

Camila Silveira Lamanes dos Santos  
Doutoranda/UFU

---

Jessica Gatti Silva  
Mestranda/ UFU

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde em primeiro lugar.

À Profa. Dra. Vicelma Luíz Cardoso pela oportunidade e por todo o comprometimento junto ao meu trabalho.

Aos meus pais pela confiança e total apoio.

Aos amigos, à toda Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia e colegas que fizeram parte da minha formação.

## RESUMO

Os surfactantes que são gerados por microrganismos têm as mesmas características de surfactantes sintéticos. Eles conseguem reduzir a tensão superficial tanto em soluções aquosas como em misturas de hidrocarbonetos. Na história recente foram relatados diferentes microrganismos como sendo geradores de diversos tipos de surfactantes. A grande maioria dos surfactantes é produzida a partir do petróleo, este que gera enorme preocupação no que tange a questão ambiental e, que como consequência estimula pesquisas voltadas à produção de surfactantes naturais. Neste trabalho estudou-se a produção de biosurfactante de um modo geral e, posteriormente foi destacado sobre os glicolipídeos que são os surfactantes microbianos mais analisados. Os raminolipídeos estão dentre os glicolipídeos, eles são produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

**Palavras-chave:** Surfactantes; microrganismos; *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

The surfactants that are generated by microorganisms have the same characteristics as synthetic surfactants. They have been able to reduce surface tension both in aqueous solutions and in hydrocarbon mixtures. In recent history different microorganisms have been reported as being generators of various types of surfactants. The great majority of surfactants are produced from petroleum, which generates enormous concern regarding the environmental issue and, as a consequence, stimulates research aimed at the production of natural surfactants. In this work the biosurfactant production was studied in a general way and, later it was highlighted on the glycolipids that are the most analyzed microbial surfactants. The raminolipids are among the glycolipids, they are produced by *Pseudomonas aeruginosa*.

**Keywords:** Surfactants; microorganisms; *Pseudomonas aeruginosa*.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	v
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
2.1 - SURFACTANTE E BIOSSURFACTANTE .....	2
2.2 - TIPOS DE BIOSSURFACTANTES .....	4
2.2.1 Glicolipídeos.....	5
2.2.2 Lipopeptídeos e lipoproteínas.....	6
2.2.3 Ácidos graxos e fosfolipídeos.....	6
2.2.4 Poliméricos.....	6
2.2.5 Particulados.....	7
2.3 - RAMINOLIPÍDEOS.....	7
2.3.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAMINOLIPÍDEOS.....	14
3 - CONCLUSÃO .....	16
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17

## 1 – INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas que apresentam grupos hidrofílicos e hidrofóbicos e atuam em interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz as tensões interfacial e superficial. Tais propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (URUM e PEKDEMIR, 2004).

Uma característica importante dos surfactantes é que estes podem conter ação emulsificante, solubilizante e formação de micelas (concentração micelar crítica-CMC, que é um dos índices mais utilizados para avaliação da atividade surfactante). Tal concentração de micelas representa a concentração de surfactante requerida para alcançar a menor tensão superficial de uma fase aquosa (ARAÚJO, DUARTE e LIMA, 2003). Conforme Barbosa e Paz (2007), os surfactantes gerados por microrganismos e os surfactantes químicos têm estruturas parecidas com a parte hidrofílica formada por aminoácidos ou peptídeos e a parte hidrofóbica formada por uma cadeia hidrocarbônica.

Os biosurfactantes são substâncias de origem microbiana com alta atividade tanto superficial como interfacial. São formados por biotransformação de matérias-primas renováveis, apresentando pouco impacto ambiental e uma grande vantagem no uso quando comparado aos detergentes químicos convencionais (BANAT et al., 2002; KIM et al., 2000). Entre as vantagens e propriedades, os biosurfactantes apresentam termoestabilidade, tolerância à força iônica, biodegradabilidade e baixa toxicidade (MULLIGAN e GIBBS, 1989).

Em países fortemente industrializados há uma corrente para a troca dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta corrente é movida pela necessidade de aplicação de bioprodutos, trocando compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biosurfactantes podem ser utilizados em áreas como agricultura, para a formulação de pesticidas e herbicidas; na alimentícia, como aditivos em condimentos; áreas farmacêuticas, têxtil, cosmética; e petrolífera, em que são vastamente utilizados para a recuperação secundária do petróleo (RON e ROSENBERG, 2002).

Ao se falar sobre as potencialidades de uso dos biosurfactantes, deve-se lembrar que essas macromoléculas são produzidas por uma vasta variedade de microrganismos e que possuem distintas estruturas químicas e propriedades de superfície. O tipo e a quantidade de

biossurfactante gerado dependem em primeiro lugar do tipo de microrganismo produtor e de fatores como fontes de carbono e nitrogênio (FRANCY et al., 1991).

## 2– REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

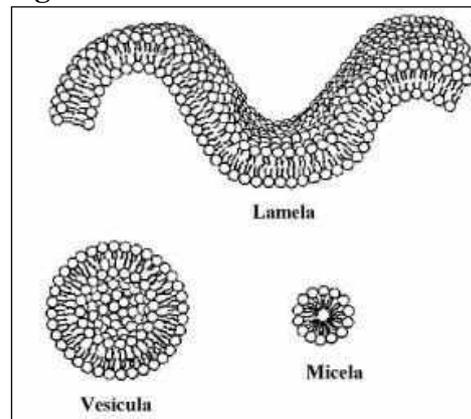
### 2.1 SURFACTANTE E BIOSSURFACTANTE

Os biossurfactantes são compostos que conseguem diminuir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos (BICCA, FLECK e AYUB, 1999). Esse feito é possível por conta de suas moléculas serem anfipáticas, assim apresenta uma parte hidrofílica e uma hidrofóbica. Tais compostos podem ser conseguidos através de reações químicas (surfactante), ou por microrganismos (biossurfactantes). No mercado mundial utiliza-se mais os surfactantes. Dados estimam que a indústria de surfactantes movimenta algo em torno de US\$ 9,4 bilhões por ano com uma demanda crescente a uma taxa de 35% ao ano. Os surfactantes produzidos por reações químicas são oriundos do petróleo, por isto a grande expectativa e interesse pelos biossurfactantes têm crescido exponencialmente ao passar dos anos (KOMA et al., 2001).

Os biossurfactantes são menos danosos ao meio ambiente, se comparado aos surfactantes sintéticos, pois apresentam como vantagem o fato de possuírem baixa toxicidade e alta degradabilidade (KOSARIC, 1996).

Estruturas como vesículas esféricas, micelas, estruturas laminares e outras são formadas pelos biossurfactantes, conforme exemplifica a Figura 1.

**Figura 1:** Formas dos biossurfactantes.



**Fonte 2.1:** CHAMPION *et al.*, 1995.

Piróllo (2006) argumenta a utilização de biossurfactantes no lugar de surfactantes químicos por apresentarem as seguintes características: biocompatibilidade em vários usos, como em aditivos alimentares por exemplo, eficiência em grandes condições de pH, temperatura e salinidade.

**Tabela 1:** Aplicações dos biossurfactantes.

<b>Funções</b>	<b>Campos de Aplicações</b>
Emulsificantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, óleos, biorremediação
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcário-água

**Fonte:** PIRÓLLO(2006).

A produção de biossurfactante está acontecendo a partir de diversos substratos, como exemplo tem-se o caso de óleos residuais de frituras. Mesmo como progresso da ciência, cientistas enfrentam o problema de equilibrar carboidratos e lipídeos com o aumento ideal para o microrganismo, e conseqüentemente para a produção de biossurfactante (NAWAWI, JAMAL e ALAM, 2010).

Os surfactantes produzidos quimicamente têm sido usados na indústria do óleo cru, de forma a auxiliar no tratamento de recuperação de ambientes devastados por derramamento de petróleo, assim como na recuperação terciária de óleo de reservatórios. Entretanto, estes compostos não biodegradam e podem ser poluentes para o ecossistema (Banat, 1995). O consumo acidental, mesmo em pequenas quantidades destes surfactantes, é impossível evitar,

pois estes são constituintes de creme dentais e cosméticos, em que seu uso frequente pode vir acarretar na sua absorção. Portanto, diversos surfactantes utilizados industrialmente são estudados com afinco quanto ao potencial efeito tóxico a seres humanos (PORTER, 1994).

## 2.2 TIPOS DE BIOSSURFACTANTES

A composição de um biossurfactante é variável de acordo com o microrganismo, pH atuante, nutrientes, substratos e na temperatura de operação, gerando diversas estruturas químicas, conforme Desai e Banat (1997).

Piróllo (2006) apresenta as principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos (Tabela 2).

**Tabela 2:** Tipos de biossurfactantes e microrganismos produtores.

<b>Tipos de biossurfactantes</b>	<b>Microrganismos</b>
<b>GLICOLIPÍDEOS</b>	
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Tirealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ,
<i>Mycobacterium</i> sp.	
<b>LIPOPETÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS</b>	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS</b>	
Ácidos Graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos Neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
<b>SURFACTANTES POLIMÉRICOS</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
<b>SURFACTANTES PARTICULADOS</b>	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

**Fonte:** PIRÓLLO, 2006.

Mukherjee, Das e Sen (2006) dividiu os biossurfactantes em uma classe que contempla os biossurfactantes com baixa massa molecular, em que estão os glicolipídeos e lipopeptídeos

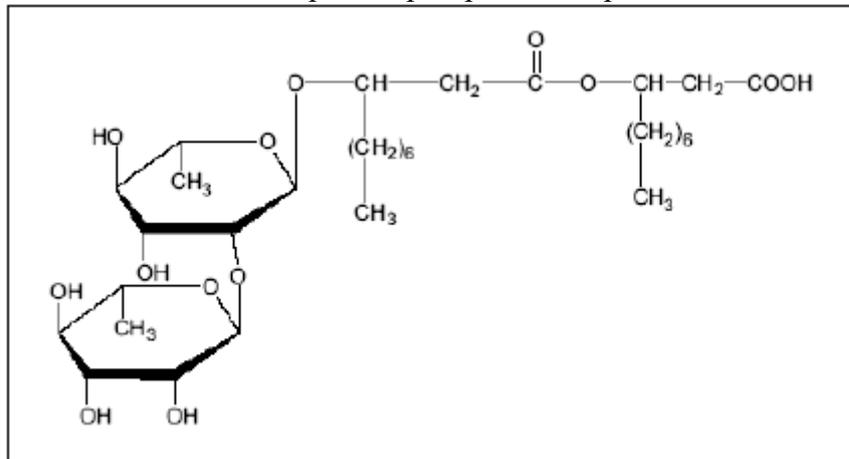
e o restante de biosurfactantes estão na classe de compostos com alta massa molecular, como exemplo tem-se os surfactantes poliméricos.

### 2.2.1 Glicolipídeos

Conforme Desai e Banat (1997) os glicolipídeos são os surfactantes microbianos mais estudados, sendo formados por uma extensa cadeia de ácidos alifáticos ligados a uma ou duas moléculas de raminose. Os raminolipídeos estão dentre os glicolipídeos, eles são produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

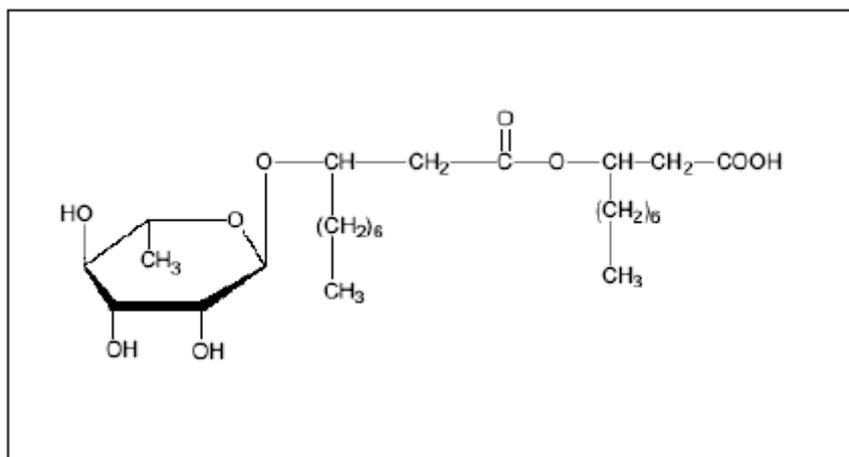
O raminolipídeo do tipo I (Figura 2.1) e tipo II (Figura 2.2) são os mais destacados glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (HELVACI, PEKER e ÖZDEMIR, 2004).

**Figura 2.2:** Estrutura do raminolipídeo tipo I produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.



**Fonte:** (DESAI e BANAT, 1997).

**Figura 2.3:** Estrutura do raminolipídeo tipo II produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.



**Fonte:** (DESAI e BANAT, 1997).

Os Raminolipídeos foram analisados por Rahman, Rahman e Kourkoutas (2003) para verificar a existência de outros métodos que aumentassem a taxa de biodegradação da borra de petróleo, e com isso tivessem redução no tempo da biorremediação. Seu estudo mostrou que o

solo contaminado, onde foi utilizado raminolipídeos no tratamento, promoveu um aumento da disponibilidade dos compostos para os microrganismos usados na biorremediação.

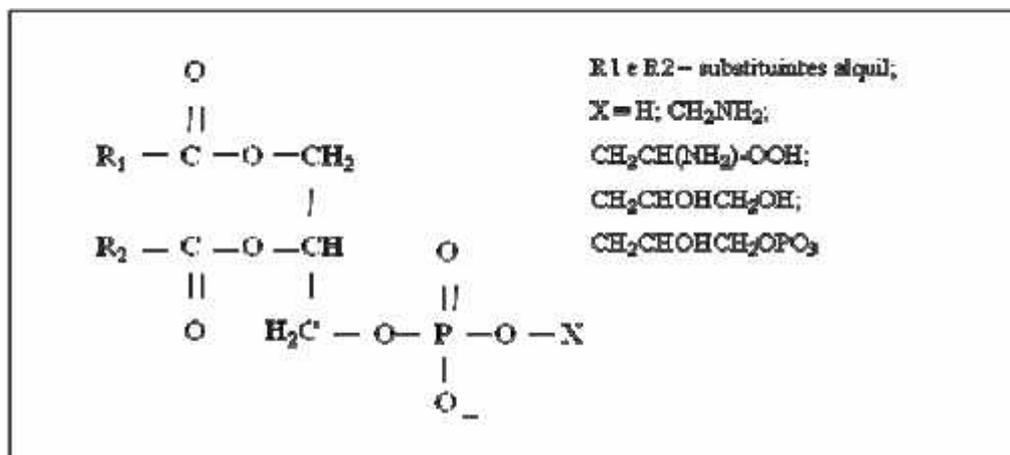
### 2.2.2 Lipopeptídeos e lipoproteínas

Os lipopeptídeos são formados por bactérias do tipo *Bacillus* que apresentam elevada eficiência atuando como tensoativos (FIECHTER, 1992). Existem lipopeptídeos com funções biológicas atuando como antibactericidas e antivirais, segundo Vollbrecht (1998). Podem atuar na membrana celular de microrganismos de maneira análoga a dos surfactantes sintéticos (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

### 2.2.3 Ácidos graxos e fosfolipídeos

A estrutura de membranas de microrganismos são compostas em sua parte por fosfolipídeos (Figura 2.3), e são arquitetados por uma molécula de glicerol ligada a duas moléculas de ácidos graxos por ligação do tipo éster. Também são unidos a um grupamento fosfato e este grupamento pode apresentar diferentes constituintes, segundo Zajic e Seffens (1984).

**Figura 2.4:** Estrutura do fosfolipídeo.



**Fonte:** (COOPER e ZAJIC, 1980).

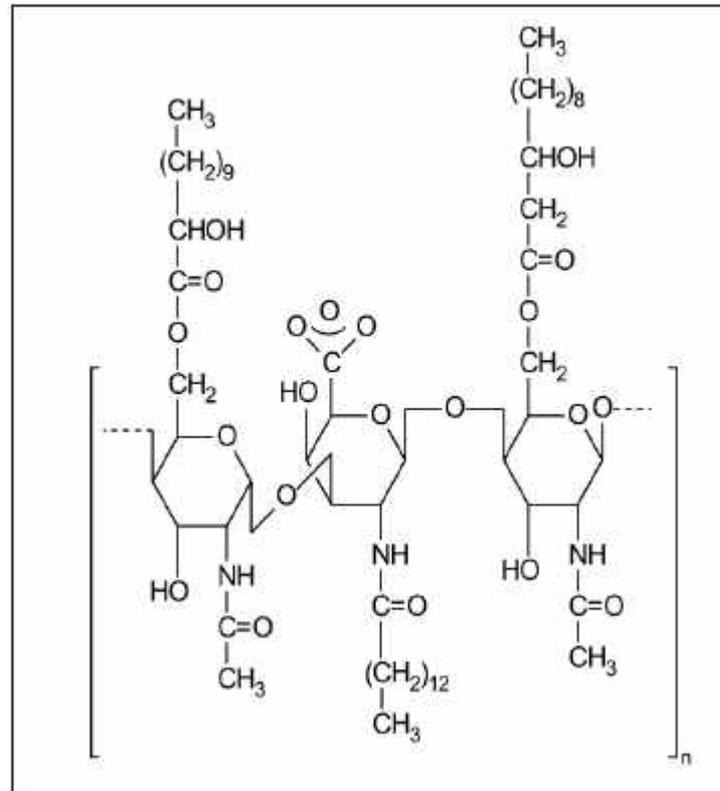
Assim como na fabricação de glicolipídeos, a fabricação de fosfolipídeos também é caracterizada pelas condições em que se deu a fermentação, podendo ser gerados diferentes tipos de fosfolipídeos (DESAI e BANAT 1997).

### 2.2.4 Poliméricos

Os biosurfactantes poliméricos caracterizam-se pela elevada afinidade por interfaces óleo/água, tornando fácil a formação de emulsões estáveis, dessa forma mesmo em baixas concentrações são alcançados altos índices de emulsificações (KOSARIC et al., 1987).

Como exemplo de biossurfactantes poliméricos encontrados no mercado tem-se o Emulsan (Figura 2.4) e o Liposan, com alto poder emulsificante (KARANTH, DEO e VEENANADING, 1999).

**Figura 2.5:** Estrutura do surfactante polimérico Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*.



Fonte: (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

### 2.2.5 Particulados

Os biossurfactantes particulados são vesículas e células microbianas com ação surfactante. Há células microbianas com alta hidrofobicidade na superfície, sendo designadas biossurfactantes. As bactérias *Acinetobacter* sp. produzem vesículas extracelulares (DESAI e BANAT, 1997).

### 2.3 RAMINOLIPÍDEOS

Raminolipídeos são formados ao longo da fase estacionária do ciclo de crescimento, por isso são chamados de metabólitos secundários (RON e ROSEMBERG, 2001), todavia, a sua função fisiológica ainda confere muitos questionamentos, visto que a presença de fontes de carbono lipídicas não se estabelece como sendo um requisito para potencializar a sua síntese. É

sabido que certos autores mencionam o mecanismo de patogenicidade de cepas dependente da ativação de genes ligados a esta síntese (ALONSO, ROJO e MARTÍNEZ, 1999).

Vários estudos demonstram a formação de inúmeros homólogos de raminolipídeos através de cepas *Pseudomonas aeruginosa* de diversas origens. Os vários meios de cultivo em que as cepas são colocadas garantem que, além da origem destas cepas, as fontes de carbono e de nitrogênio usadas nas fermentações, como também a idade do cultivo influenciam na composição da mistura de homólogos, como pode ser exemplificado pela Tabela 3 (Arquimedes, 2009).

**Tabela 3:** Estudos de caracterização estrutural de raminolipídeos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

<b>Cepa</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>Fonte de nitrogênio</b>	<b>Tempo de cultivo (dias)</b>	<b>Principais homólogos produzidos</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP	Manitol	NaNO <sub>3</sub>	–	Rha2-C10-C10, Rha-C10-C8 e Rha-C10-C10	Deziel et al., 1999.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	Soapstock (subproduto do refino de óleo de soja bruto)	NaNO <sub>3</sub>	–	Rha2-C10-C10 e RhaC10-C10	Benincasa, Contiero e Manresa, 2002.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	Óleo de palma	Peptona	2	Rha-C10-C10	Pornsunthorn et al., 2008.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Ácidos graxos livres	NaNO <sub>3</sub>	4	Rha-C10-C10 e Rha2-C10-C10	Abalos et al., 2001.

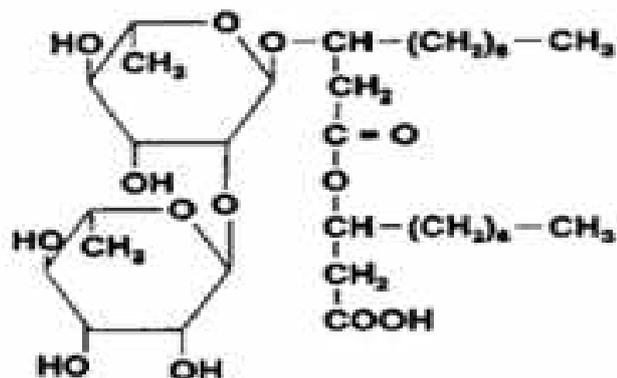
<b>Cepa</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>Fonte de nitrogênio</b>	<b>Tempo de cultivo (dias)</b>	<b>Principais homólogos produzidos</b>	<b>Referência</b>
Pseudomonas aeruginosa AT10	Ácidos graxos livres	NaNO <sub>3</sub>	4	Rha2-C10-C10 e RhaC10-C10	Abalos et al., 2001.
Pseudomonas aeruginosa 47T2	Óleo derivado de processos de fritura	NaNO <sub>3</sub>	4	Rha2-C10-C10, Rha-C10-C10 e Rha2-C10-C12	Haba, Espuny e Busquets 2000.
Pseudomonas aeruginosa LBI	Óleos vegetais brasileiros	NaNO <sub>3</sub>	5	Rha-C10-C10 e Rha2-C10-C10	Costa et al., 2006.
Pseudomonas aeruginosa LBI	Glucose	NaNO <sub>3</sub>	6	Rha2-C10-C10	Nitschke et al., 2005.
Pseudomonas aeruginosa DSM 2659	Glucose	NaNO <sub>3</sub>	7	Rha-C10-C10 e Rha2-C10-C10	Schenk, Schuphan e Schmidt, 1995.
Pseudomonas aeruginosa AP02-1	Glicerol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7	Rha2-C10-C10 e RhaC10-C10	Perfumo et al., 2006.
Pseudomonas aeruginosa UFPEDA 614	Glicerol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9	Rha2-C10-C10 e RhaC10-C10	Monteiro et al., 2007.
Pseudomonas aeruginosa 57RP	Naftaleno	NaNO <sub>3</sub>	14	Rha2-C10	Deziel et al., 1999.
Pseudomonas aeruginosa UG2	Óleo de milho	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16	Rha-C10-C10 e Rha2-C10-C12	Mata-Sandoval, 1999

Os raminolipídeos (Figura 2.6) estudados inicialmente foram obtidos a partir de *Pseudomonas aeruginosa* e, assim isolados destes, foram objetos de estudo por Jarvis e Johnson em 1949. Raminolipídeos que carregam consigo em sua composição apenas uma molécula de glicose são chamados por mono-raminolipídeos e os que possuem duas moléculas são chamados de di-raminolipídeos.

Os glicolipídeos que mais se destacam produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são os raminolipídeos dos tipos 1 e 2, conforme citados anteriormente. Os raminolipídeos do tipo 3 e 4 são formados por metilésteres oriundos dos raminolipídeos do tipo 1 e 2 (DESAI e BANAT, 1997).

A composição de uma junção de raminolipídeos oferece suas propriedades físico-químicas do surfactante.

**Figura 2.6:** Estrutura molecular do raminolipídeo.



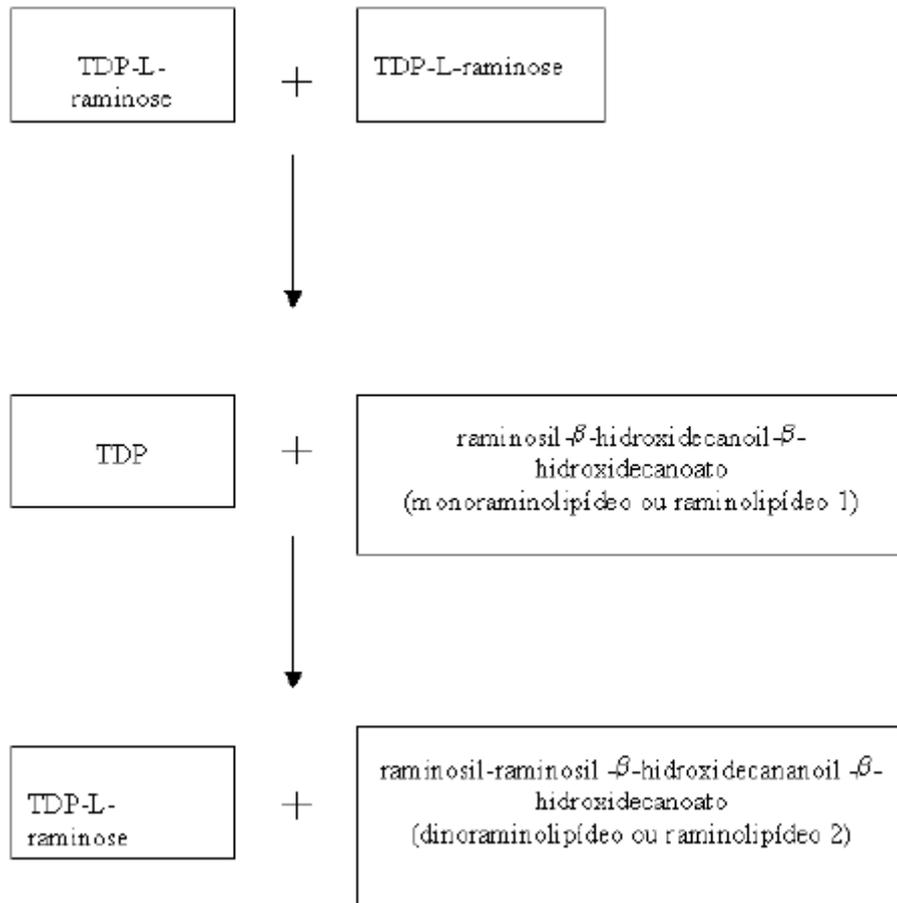
**Fonte:** (DESAI e BANAT, 1997).

A síntese de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* também foi objeto de estudo por Juwarkar, Nair e Dubey (2007), sendo o núcleo de estudo a retirada de cádmio e chumbo de solos infectados. Usando uma solução com 0,1% de raminolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* obteve-se uma retirada de 92% de cádmio e 88% de chumbo em testes por um período total de 36 horas. A retirada destes metais, no mesmo solo infectado, utilizando apenas água pura teve como resultado a remoção de cádmio e chumbo, respectivamente, de 2,7% de 9,8%.

A formação de raminolipídeo confere de uma série de reações de mudança do grupo glicosil, cada uma catalisada por uma raminosil transferase específica, junto a timidinadifosfato-L-raminose (TDP-raminose) atuando como um doador de raminose e os monoraminoilídeos atuando como os receptores (MAYER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000).

Na figura 2.7 ilustra-se o sequenciamento de reações que resultam na produção de raminolipídeos, conforme Ochsner e Reiser (1995).

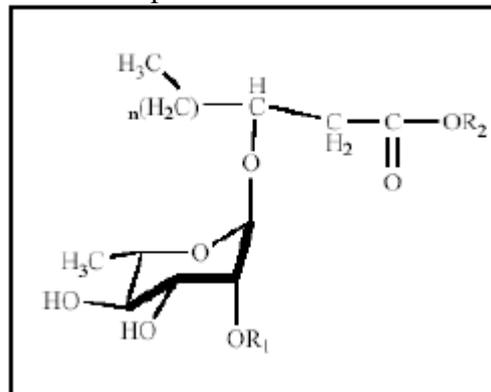
**Figura 2.6:** Biossíntese de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*.



**Fonte:** (OCHSNER e REISER 1995).

Publicações recentes têm mostrado que os raminolipídeos conferidos por 1(R1) e 2(R2) são sintetizados como parcela de mistura complexa de raminolipídeos. Tais compostos são dotados de uma ou duas moléculas de raminose ligadas a uma ou duas moléculas de hidróxi ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeia. As inúmeras combinações destes grupos produzem um elevado número de possíveis homólogos (DÉZIEL et al., 1999). A figura 2.7 mostra a estrutura geral de raminolipídeos produzidos pelo gênero *Pseudomonas*.

**Figura 2.8:** Estrutura química da molécula de raminolipídeos.



**Fonte:** (ABALOS et al, 2001).

R1 = H2 (monoraminolipídeos) ou  $\alpha$ -L- raminopiranosil (diraminolipídeos).

R2 = cadeia hidrocarbonada saturada ou insaturada com C8 – C12.

Uma característica favorável dos raminolipídeos frente aos surfactantes é o fato de possuírem baixa toxicidade. Como exemplo, o raminolipídeo formado por *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 quando comparado a um surfactante químico, apresentou uma toxicidade 10 vezes menor (SANTA ANNA, SORIANO e GOMES, 2007).

O tratamento de queimaduras utilizando raminolipídeos também foi uma área de estudo por Stipevic et al. (2006), tratando alguns ratos com uma solução de 0,1% de raminolipídeo como resultado obteve-se cicatrização em 35 dias, ao passo de que em ratos não tratados o ferimento foi cicatrizar apenas em 45 dias.

Wu et al. (2007) estudaram *Pseudomonas aeruginosa* isolando em fontes de carbono distintas, tais como glicose, óleo vegetal e ácidos graxos, e de nitrogênio (nitrato de amônio e uréia), conforme Maier e Chavez (2009), a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio alteram a produção de raminolipídeo. O glicerol e a glicose se mostraram bastantes eficientes na geração de carbono. Nos trabalhos de Wu et al. (2007), a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* EM1 não conseguiu usar de forma eficiente a sacarose como substrato na produção de raminolipídeo. A geração de nitrogênio mais eficiente para *Pseudomonas aeruginosa* EM1 foi  $\text{NaNO}_3$ .

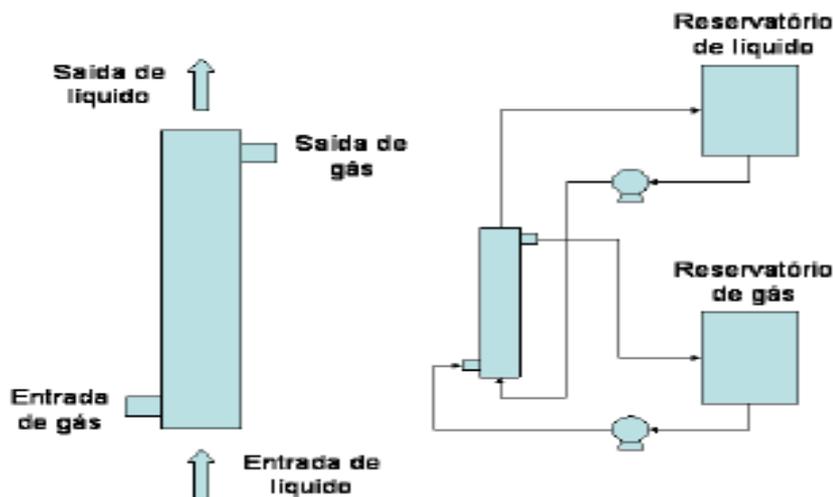
Benincasa, Contiero e Manresa (2002) analisaram a geração de raminolipídeos através de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, separada em solo poluído com petróleo, advindo de um resíduo do processamento de óleo de girassol. O meio utilizado na síntese dotava-se de nitrato, fontes de magnésio, ferro, fosfatos, potássio, cálcio, traços de boro, extrato de levedura, cobre, managanês, molibdênio e zinco. Notou-se uma elevação na síntese do biosurfactante após esgotada a fonte de nitrogênio. Na produção em regime batelada num fermentador, foi instigado que a elevação no abastecimento de oxigênio aumentou a concentração final gerada

de raminolipídeos. Conjuntamente foi mencionado o efeito de uma realimentação (batelada alimentada) das fontes de nitrogênio e carbono. Aconteceu um leve aumento na concentração de biomassa seguido de um acréscimo exponencial na produção de raminolipídeos. A eficácia resultante foi de 0,2 g/L.h com uma concentração final de 15,9 g/L .

Haba, Espuny e Busquets (2000) analisaram o fato de se produzir raminolipídeos por meio de resíduos de óleos de fritura, visto que se trata de um substrato com baixo valor econômico. O acréscimo da concentração inicial da fonte de nitrato e nitrogênio provocou um aumento na concentração de biomassa e na síntese de raminolipídeos. A maior eficiência foi conseguida com uma relação carbono/nitrogênio de 8, alcançando 2,7 g/L, expressos em raminose.

Gruber, Chmiel e Kappeli (1993) mencionaram a necessidade na delimitação nas concentrações de nitrogênio e ferro para a síntese de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. Por meio de um reator CSTR, com reciclo de células e um contactor de membranas para a oxigenação e saída de gás carbônico, foi alcançado uma produtividade volumétrica de até 545 mg/L.h de raminolipídeos a partir de glicose, com eficácia de 41 mg/g.h quando empregada taxa de diluição de 0,18/h.

**Figura 2.9:** Esquema de um contactor gás/líquido.



**Fonte:** (KRONEMBERGER, 2007).

Santos, Sampaio e Vasquez (2002) analisaram a produção de raminolipídeos pela cepa PA1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Através do glicerol como substrato, foi alcançado uma elevação de 62% na produtividade volumétrica com a elevação da concentração inicial de

células de 0,32 para 3,0 g/L, alcançando 23,2 mg/L.h. A relação carbono/nitrogênio foi outro ponto analisado, os resultados mais satisfatórios foram conseguidos com maiores relações carbono/nitrogênio, reafirmando com os demais resultados postados na literatura que descrevem uma elevação na produtividade em condições limitantes de nitrogênio. No que tange à fonte de carbono, os resultados apontaram o uso de glicerol. Tal substrato atingiu uma produção de 3,34 g/L do biossurfactante expressos em raminose, ao ponto que a utilização de soja, etanol ou óleo de oliva, chegou-se em valores de 1,59, 2,02 e 1,61 g/L, respectivamente. Conjuntamente foi averiguado a proporção dentre as espécies de raminolipídeos produzidas. Trabalhando com glicerol como sendo o substrato, foram formados cerca de 85% de diraminolipídeos e 15% de monoraminolipídeos.

Santa Anna, Soriano e Gomes, (2002) checaram a formação de raminolipídeos através de *Pseudomonas aeruginosa* PA1. Contrapondo entre o uso de n-hexadecano, óleo parafínico, óleo de babaçu e glicerol, como vias de carbono, corroborou a ideia do glicerol ser uma fonte melhor aceitável pelos microrganismos, conferindo assim uma maior produtividade.

### **2.3.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE RAMINOLIPÍDEOS**

Biossurfactantes que abaixam a tensão superficial com menores valores de concentração micelar crítica (CMC) são escolhidos visando a economia, mas para estudos de biorremediação usando consórcios microbianos, parte dos biossurfactantes conseguem utilizar efeitos tóxicos aos microrganismos quando do acúmulo em valores elevados de sua CMC (Whang et al., 2008).

Os monoraminolipídeos são comumente mais eficazes quando da solubilização de compostos hidrofóbicos, característica esta devido ao fato de possuírem elevado caráter apolar e baixos valores de concentração micelar crítica (CMC). Todavia, em uma etapa seguinte de mineralização, a permanência do composto hidrofóbico dissolvido em micelas de monoraminolipídeos desfavorece a ligação dos microrganismos a tais compostos (ZHANG, MAIER e MILLER, 1997). Portanto, o propósito de se utilizar diraminolipídeos é positivo, desde que seu uso seja, não apenas a retirada de poluentes hidrofóbicos, como também a seguinte mineralização. Confere desta forma, que a decomposição de poluentes hidrofóbicos decorre de um arranjo entre a solubilização e a disponibilidade no interior das micelas do surfactante (ARQUIMEDES, 2009).

Os raminolipídeos são formados por uma mistura de homólogos parecidos, podendo gerar grande dificuldade na separação de quantidades isoladas de cada um dos componentes para futuros estudos de aplicação. Soma-se também o valor da técnica de separação dos

homólogos não ser recomendável para concretizar seu uso na indústria (ARQUIMEDES, 2009). Em contrapartida, a junção de homólogos tem a vantagem de conter características físico-químicas que auxiliam em aplicações ambientais, características estas que resultarão da composição estrutural individual do homólogo existente e da proporção que cada um deles influencia na mistura (ABALOS et al., 2001).

Características tais como, comprimento das cadeias de ácidos graxos e a existência de insaturações em tais cadeias, interferem nas propriedades físico-químicas (ARQUIMEDES, 2009). A elevação do comprimento da cadeia carbônica ajuda para o aumento apolar da molécula, contribuindo para menores valores de CMC, ao passo que a presença de uma ou mais insaturações muda a constituição das moléculas que geram as micelas, intervindo de forma negativa na CMC, o que vale dizer no aumento nos índices dessa variável (HABA, ESPUNY e BUSQUETS, 2000; ABALOS et al., 2001; MATA-SANDOVAL, KARNS e TORRENTS, 1999).

O índice de emulsificação é um apontador bastante usado para mensurar a atividade surfactante, este é elucidado como a capacidade da solução contendo o biossurfactante, ou uma junção de biossurfactantes, de dissolver hidrocarbonetos distintos (ARQUIMEDES, 2009). O índice de emulsificação (E) é conseguido mensurando a altura da camada emulsionada (cm) depois de certo tempo, dividindo-se a altura total do líquido e multiplicando-se por 100 (COOPER e GOLDERMBERG, 1983). Na Tabela 4 são mostrados valores de E24 (índice de emulsificação após 24h) para hidrocarbonetos diversos (ARQUIMEDES, 2009).

**Tabela 4:** Índices de emulsificação de raminolipídeos produzidos por diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos por hidrocarbonetos distintos.

<b>Microrganismo</b>	<b>E24 Diesel</b>	<b>E24 Gasolina</b>	<b>E24 Querosene</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UFPEDA 614	64	60	65	Monteiro et al., 2007.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	–	–	50	Benincasa & Accorsini, 2008.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM1	74	–	71	Wu et al., 2007.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	–	–	92	Costa et al., 2006.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DHT2	66	47	56	Kumar et al., 2008.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	–	–	71	Nitschke et al., 2005.

### 3 – CONCLUSÃO

Ao longo de toda a revisão bibliográfica do presente trabalho é possível entender os inúmeros estudos acerca dos surfactantes, visto as diversas áreas de atuações em que podem ser empregados, como por exemplo, nas áreas de cosméticos, agricultura, mineração, produtos de limpeza e outras. A preocupação ambiental levou ao estudo de uma forma menos agressiva ao ecossistema e, assim os vários estudos voltados aos surfactantes naturais, que são gerados a partir de microrganismos, fato este que abre um enorme leque de estudos e análises acerca de qual microrganismo é mais viável para produzir um biosurfactante. Os raminolipídeos se mostraram bastantes interessantes visto as diversas formas de produção e áreas importantes de sua atuação como na descontaminação de solos e no tratamento de queimaduras.

#### 4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS, A. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from oil refinery wastes. **Langmuir**, n. 17, p. 1367-1371. 2001.
- ALONSO, A.; ROJO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. **Environmental Microbiology**, n. 1(5), p. 421-430. 1999.
- ARAÚJO, J. M.; DUARTE, M. d.; LIMA, G. M. **Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo**. Brasília: 30. 2003.
- ARQUIMEDES, S. F. **Raminolipídeos produzidos por Pseudomonas Aeruginosa UFPEDA 614: Estudos de produção e de variação da composição de homólogos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresearch**, n.51 p.1-12. 1995.
- BANAT, I. M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost. **Biotechnology Prog**, p.1277-1281. 2002.
- BARBOSA, M. M.; PAZ, M. C. Produção de Biossurfactantes por *Chromobacterium*. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 1-9. 2007.
- BENINCASA, M.; ACCORSINI, F. R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**. Vol. 99, p. 3843-3849. 2008.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering** n.54, p. 283-288. 2002
- BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista De Microbiologia**, p. 231-236. 1999.
- CAMEOTRA, S. S; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactant in extreme conditions. **Microbiol Biotechnol** n.50, p. 520-529. 1998.
- CHAMPION, J. T., et al. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, p. 569-574. 1995.
- COOPER, D. G.; GOLDEMBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, n. 53, p. 224-229. 1987.

- COOPER, D. G.; ZAJIC, L. E. Surface-active compounds from microorganism. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 26, p. 229-252. 1980.
- COSTA, S., et al. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochemistry*, n. 41, p. 483–488. 2006.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactantes and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology. Reviews, American Society for Microbiology*, p. 47-64. 1997.
- DEZIEL, E., et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochemical et Biophysical Acta*, n. 1440, p. 244-252. 1999.
- FIECHTER, D. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*, p. 208-216. 1992.
- FRANCY, D.S., et al. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industry Microbiology*, p. 237-246. 1991.
- GRUBER, T., CHMIEL, H., KAPPELI, O. Integrated process for continuous rhamnolipid biosynthesis. **In: Kosaric, N. (ed), Biosurfactants (Surfactants Science Series) 48**, chapter 5, p. 157-173. 1993.
- HABA, E., ESPUNY, M. J., BUSQUETS, M. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology* n. 88, p. 379-387. 2000.
- HELVACI, S. S., PEKER, S., ÖZDEMİR, G. Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces* n.35, p. 225-233. 2004.
- JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.*, p. 4124-4126. 1949.
2007. JUWARKAR, A. A.; NAIR A.; DUBEY, K. V. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere* **68**, 1996-2002.
- KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADING. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, n. 77, p. 116-126. 1999.
- KIM, S. H., LIM, E. J., D., LEE, T. H. Purification and charaterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnology Applied Biochemistry*, vol. 31, p. 249-253. 2000.
- KOMA, D., et al. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobactersp*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, p. 94-96. 2001.
- KORASIC, N. Biosurfactantes. *Biotechnology*, cap. 17. 1996.
- KOSARIC, N., et al. The role of nitrogen in muliorganism strategies for biosurfactant production. *JAOCs*, vol. 61, n. 11. 1987.
- KRONEMBERGER, F. A. Produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. 2007. Tese (Doutorado em

- Engenharia Química)-Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Do Rio De Janeiro. 2007.
- KUMAR, M., et al. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 24, p. 1047–1057. 2008.
- MAIER, R.M.; CHAVEZ, G.S. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 54, p. 625–633. 2009.
- MATA-SANDOVAL, J., KARNS, J., & TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography A.**, n. 864, p. 211-220. 1999.
- MAYER, R.M.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 54, p. 625-633. 2000.
- MONTEIRO, S. A. Caracterização molecular e estrutural de biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. 2007. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial. **Trends Biotechnol**, p. 509-515. 2006.
- MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant. **Journal of Biotechnology**, p. 37-44. 1989.
- NAWAWI, W. M. F. W.; JAMAL, P.; ALAM, M. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, 101. 2010.
- NITSCHKE, M.; PASTORE G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Revista Química Nova**, p. 772-776. 2002.
- NITSCHKE, M., et al. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, n. 21, p. 1562-1566. 2005.
- OCHSNER, U. A.; REISER, J. (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, n. 92 p. 6424 - 6428.
- PERFUMO, A., et al. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO2-1. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.72, p. 132-138. 2006.
- PIRÔLLO, M. P. Estudo da Produção de Biossurfactantes utilizando Hidrocarbonetos. **Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, 61. 2006.
- PORNSUNTHORNTAWEE. O.; WONGPANIT, P.; SUMAETH C.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude

biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**. Vol. 99, p. 1589-1595. 2008.

PORTER, M. **Handbook of surfactants**: Chapman & Hall, 2a ed. 1994.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; KOURKOUTAS, Y. Enhanced bioremediation of nalkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology** n. 90, p. 159-168. 2003.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 249–252. 2002.

SANTA ANNA, L. M. M.; SORIANO, A. U.; GOMES, A. C. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**., p. 687-691. 2007.

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. W.; VASQUEZ, G. S. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 100, n. 1- 3, p. 1025-1036. 2002.

SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography A**, n. 693, p. 7-13. 1995.

STIPCEVIC, T.; PILJAC, A.; PILJAC, G. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid, **Burns** **32**, p. 24-34. 2006.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, p. 1139–1150. 2004.

WHANG, L.M. et al. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**, n. 151, p. 155–163. 2008.

WU, J.-Y. et al. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Article of Bioresource Technology**, p. 1157-1164. 2007.

ZAJIC, J. E.; SEFFENS, W. In: CRC Critical Reviews in Biotechnology. **Biosurfactants**, v.1, n.2. 1984.

ZHANG, Y.; MAIER, W.; MILLER, R. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. **Environmental Science Technology**, n. 31, p. 2211-2217. 1997.