

# Biosurfatantes a partir de resíduos agroindustriais

Avaliação de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biosurfatantes por *Bacillus*

## Márcia Nitschke

Doutoranda em Ciência de Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
nitschke@bol.com.br

## Gláucia Maria Pastore

Prof. Dr<sup>a</sup> - Laboratório Bioquímica de Alimentos  
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
glaupast@fea.unicamp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

## Introdução

Os surfatantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. Estima-se que a produção mundial de surfatantes exceda 3 milhões de toneladas por ano (Banat, 2000), sendo utilizados principalmente como matéria-prima na fabricação de detergentes de uso doméstico.

A grande maioria dos surfatantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental dos consumidores combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram os cientistas a pesquisar surfatantes biológicos como alternativa para os produtos existentes.

Os biosurfatantes produzidos por microrganismos vêm, nos últimos anos, despertando considerável interesse devido à sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações. Entre as aplicações comerciais dos biosurfatantes destacam-se a recuperação do petróleo, biorremediação de poluentes, formulação de lubrificantes, além de diferentes utilizações na indústria têxtil, cosmética, alimentícia e farmacêutica.

Atualmente, os biosurfatantes ainda não são amplamente utilizados pela indústria, devido ao seu alto custo de produção, associado a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros.

Porém, o problema econômico da produção de biosurfatantes pode ser significativamente reduzido por meio do uso de fontes alternativas de nutrientes facilmente disponíveis e de baixo custo.

Uma possível alternativa para a produção de biosurfatantes seria o uso de subprodutos agrícolas ou de processamento industrial. Atualmente, o aproveitamento de resíduos vem sendo incentivado por contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como por permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam simplesmente descartados.

## O que são biosurfatantes?

Os biosurfatantes possuem uma estrutura comum: uma porção lipofílica, usualmente composta por cadeia hidrocarbonada de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (Cameotra & Makkar, 1998; Bognolo, 1999). Os microrganismos produtores distribuem-se em diversos gêneros, sendo a maioria produzida por bactérias. As principais classes de biosurfatantes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas; fosfolipídios e ácidos graxos; surfatantes poliméricos e surfatantes particulados (Desai & Desai, 1993).

Em relação aos surfatantes convencionais, os biosurfatantes apre-

sentam vantagens como (Bognolo, 1999):

- elevada atividade superficial e interfacial, o que os torna comparáveis ou superiores aos sintéticos (detergentes aniônicos sulfatados) em termos de efetividade e eficiência;
- maior tolerância a pH, temperatura e força iônica;
- biodegradabilidade;
- baixa toxicidade.

Os biosurfatantes apresentam ainda a vantagem de poder ser sintetizados a partir de substratos renováveis e de possuir grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (Desai & Banat, 1997). Outra vantagem dos biosurfatantes reside no fato de não serem compostos derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. Além disso, a estrutura química e as propriedades físicas dos biosurfatantes podem ser modificadas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de novos produtos para necessidades específicas.

### Substratos não convencionais

O sucesso da produção industrial de biosurfatantes depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de matérias-primas de baixo custo, uma vez que estas representam entre 10% a 30% do custo total (Cameotra & Makkar, 1998). Apesar disso, poucos trabalhos têm sido publicados com vistas a produzir biosurfatantes a partir de resíduos (Tabela 1). A dificuldade

na seleção de um resíduo está em encontrar a composição adequada de nutrientes que permita o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse. Em geral, substratos agroindustriais que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos suprem a necessidade de fonte de carbono para a produção de biosurfatantes. O estabelecimento de um processo biotecnológico a partir desses substratos alternativos também apresenta outra dificuldade, que é a padronização devido às variações naturais de composição, bem como os custos de transporte, armazenagem e tratamento prévio necessários. Entretanto, a utilização de resíduos pode diminuir os custos de produção para níveis competitivos em relação aos similares obtidos por via petroquímica e, ao mesmo tempo, reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos do tratamento (Mercade & Manresa, 1994; Makkar & Cameotra, 1999a; Makkar & Cameotra, 2002). Finalmente, deve-se considerar que o Brasil é um país essencialmente agrícola e que, portanto, a quantidade e a facilidade de acesso aos subprodutos agroindustriais é bastante significativa.

### Biosurfatantes produzidos por *Bacillus*

Algumas bactérias do gênero *Bacillus* produzem diversos lipopeptídeos que demonstram atividade tensoativa (Rosenberg & Ron, 1999). As culturas de *Bacillus subtilis* produzem um lipopeptídeo cíclico conhecido como surfactina ou subtilisina (Arima *et al.*, 1968), considerado um dos mais potentes biosurfatantes conhecidos (Figura 1). A surfactina também demonstrou atividade anticoagulante, antitumoral, antimicrobiana, e, mais recentemente, estudos comprovaram atividade antiviral e antimicoplasmática (Vollenbroich *et al.*, 1997a, 1997b).

O objetivo deste estudo foi verificar a potencialidade do uso de substratos alternativos para a produção de biosurfatante por isolados de *Bacillus*.

### Materiais e Métodos

Foram utilizados cinco isolados de *Bacillus sp.* produtores de biosurfatante pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos. Para a

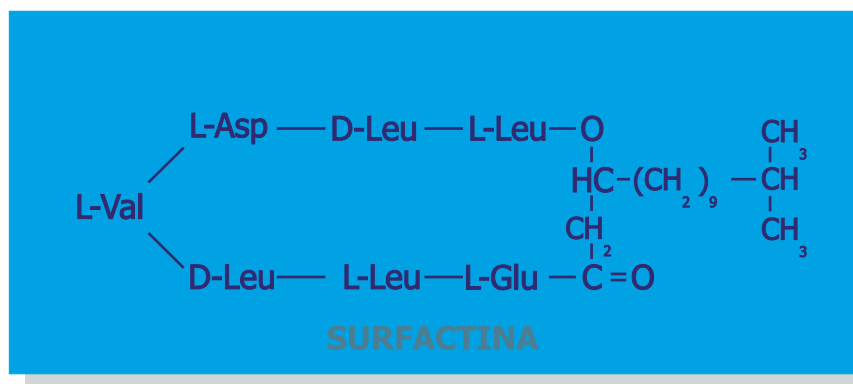


Figura 1. Estrutura da surfactina produzida por *Bacillus subtilis*.

**Tabela 1. Exemplos de utilização de resíduos na produção de biosurfatantes**

Substratos	Classe química	Microrganismo	Referência
Efluente extração óleo oliva	rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas sp.</i>	Mercade <i>et al.</i> , 1993
Resíduos refino óleo de soja	rhamnolipídeos	<i>P. aeruginosa</i>	Abalos <i>et al.</i> , 2001
Água lavagem de batatas	lipopeptídeos	<i>B. subtilis</i>	Fox & Bala, 2000
Melaço	lipopeptídeos	<i>B. subtilis</i>	Makkar & Cameotra, 1997
Soro de leite	rhamnolipídeos	<i>P. aeruginosa</i>	Koch <i>et al.</i> , 1988
Água de turfa	lipopeptídeos	<i>B. subtilis</i>	Sheppard & Mulligan 1987
Óleo de fritura usado	rhamnolipídeos	<i>P. aeruginosa</i>	Haba <i>et al.</i> , 2000
Óleo lubrificante usado	glicolipídeos	<i>Rhodococcus sp.</i>	Mercade <i>et al.</i> , 1996
Soro leite desproteínizado	sophorolipídeos	<i>C. bombicola</i>	Daniel <i>et al.</i> , 1998
Manipueira	lipopeptídeos	<i>B. subtilis</i>	Santos <i>et al.</i> , 1999

produção de biosurfatante foram utilizados:

- melão (3% v/v sólidos solúveis) pH 6,0;
- manipueira (resíduo líquido proveniente da fabricação de farinha de mandioca) pH 5,8-5,9;
- soro de leite (fabricação de queijo mussarela) pH 6,4 ;
- meio sintético proposto por Cooper *et al.* (1981) pH 6,8-6,9.

A manipueira foi tratada previamente com aquecimento a 100°C, por 3 minutos e centrifugação a 10.000 rpm, por 20 minutos, para remoção de sólidos. O pH dos resíduos não foi ajustado. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C, por 20 minutos.

Uma alçada das culturas mantidas a 4°C foi transferida para erlenmeyer de 50 mL, com 20 mL de caldo nutriente e incubada em agitador rotatório a 120 rpm, 30°C, por 24 horas. Após, 1 mL de cada cultura a ser testada foi inoculado em frascos erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL dos respectivos meios, que foram incubados em agitador rotativo tipo shaker a 30°C e 150 rpm, por 72 horas. Os meios foram centrifugados a 10.000 rpm, por 15 minutos, e o sobrenadante, livre de células, utilizado para determinações analíticas.

A tensão superficial foi determinada em tensiômetro Krüss, modelo K12, utilizando o método da placa. O biosurfatante foi isolado do meio de cultivo por precipitação ácida a pH 2,0, seguida de extração com clorofórmio/metanol (65:15), segundo Makkar & Cameotra (1999b). A atividade emulsificante ( $E_{24}$ ) foi realizada em tubos com tampa rosca contendo 4 mL de solução aquosa, 1mg/mL de biosurfatante (obtido em manipueira) adicionados de 6 mL de hidrocarbonetos, sendo que cada tubo foi submetido a vortex máximo por 2 minutos e deixado em repouso por 24 horas. O índice  $E_{24}$  foi determinado medindo-se a altura da camada emulsionada (cm) dividindo-a pela altura total de líquido x 100. A remoção de petróleo de areia contaminada foi testada através da saturação de 60g de areia com 5 mL de petróleo. Porções de 20g da areia contaminada foram

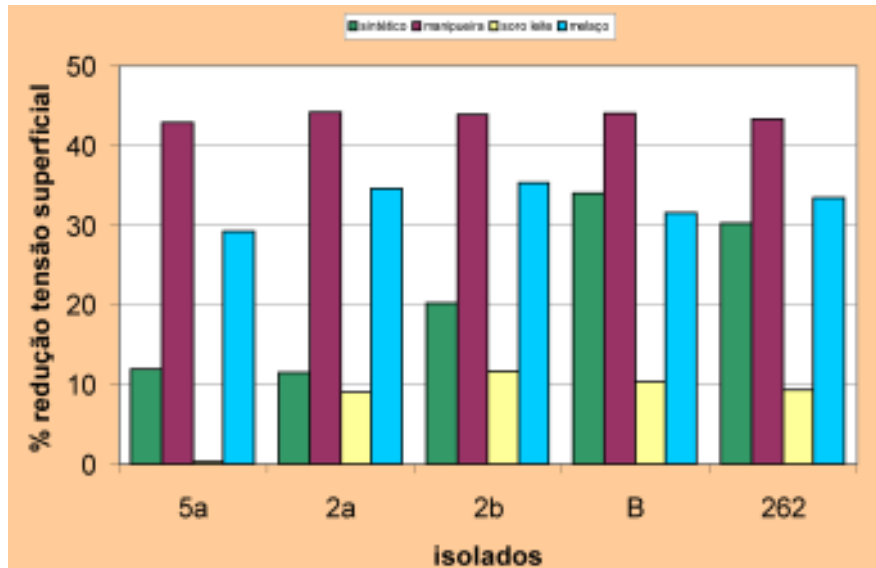


Figura 2. Percentagem de redução na tensão superficial obtida por isolados de *Bacillus* sp. em diferentes substratos.



Figura 3. Atividade emulsificante ( $E_{24}$ ) de solução de biosurfatante frente à diferentes hidrocarbonetos. (1) Hexano, (2) Tolueno, (3) Heptano, (4) Decano, (5) Querosene, (6) Tetradecano, (7) Hexadecano, (8) Óleo de soja, (9) Gordura de côco.

colocadas em erlenmeyer de 250 mL, adicionando-se-lhe 20 mL de água (frasco controle) e 20 mL de solução aquosa 1mg/mL de biosurfatante obtido (frasco teste). Os frascos foram agitados a 150 rpm, por 12 horas em temperatura ambiente. Retirou-se deles o líquido da primeira lavagem e procedeu-se a uma segunda adição de 20 mL de água e biosurfatante, incubando-os nas mesmas condições acima. O líquido da segunda lavagem foi removido e a areia foi retirada do frasco sendo colocada em estufa a 50°C até a secagem.

## Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nos ensaios de produção de biosurfatante em diferentes substratos alternativos são mostrados na Figura 2. Nota-se que todos os isolados testados demonstraram capacidade de produzir biosurfatante e, conseqüentemente, de reduzir a tensão superficial dos meios testados, sendo que a manipueira forneceu as maiores percentagens de redução, na ordem de 42%, para todos os isolados testados; entretanto, o soro de leite apresentou uma redução média

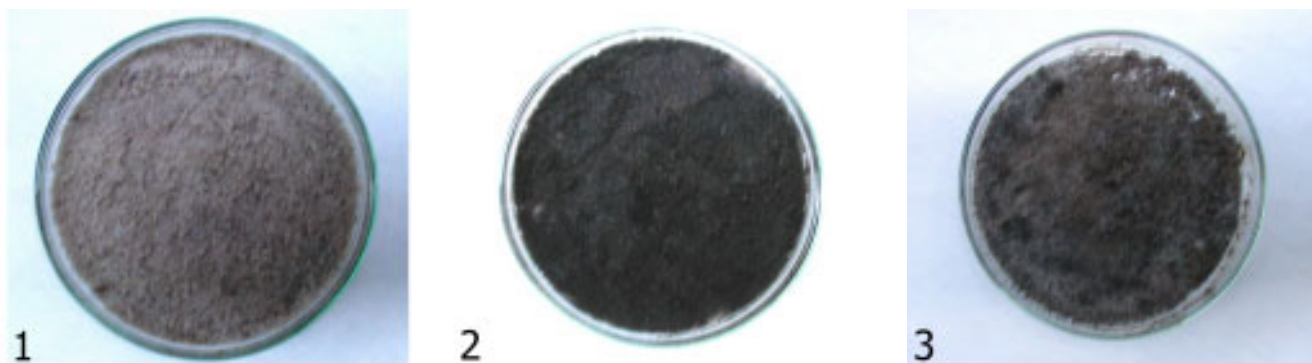


Figura 4. Capacidade de remoção de petróleo de amostra de areia utilizando solução de biosurfactante. (1) Biosurfatantes, (2) controle, (3) água.

**Tabela 2. Atividade emulsificante do biosurfactante obtido em manipueira**

Hidrocarboneto	E <sub>24</sub> (%)
Hexano	66,6
Tolueno	72,7
Heptano	66,6
Decano	70,4
Querosene	70,4
Tetradecano	70,9
Hexadecano	69,0
Óleo de soja	74,0
Gordura e côco	70,9
Petróleo	69,0

de 10% , ressaltando que o isolado LB5a não produziu surfatante nesse resíduo. O melão também demonstrou boa potencialidade como substrato para produção de biosurfatante pelos microrganismos testados e apresentou redução média de, aproximadamente, 33%. O meio sintético utilizado como padrão foi definido por Cooper *et al.* (1981), para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 e vem sendo utilizado, desde então, como uma referência para a produção de biosurfatantes de *Bacillus*. Nota-se que, apesar de permitir a produção de biosurfatante por todos os isolados, esse meio mostrou resultados inferiores (com redução média de 21,5%) aos da manipueira e do melão, sugerindo que estes dois resíduos possuem uma composição de nutrientes adequada para a produção de biosurfatantes.

Embora a composição química varie de acordo com a época do ano e com o tipo de cultivar de mandioca, a manipueira possui em sua composição uma grande quantidade de carboidratos (40-60 g/L.) destacando-se ainda a presença de frutose, glicose e sacarose, além de nitrogênio (1-2 g/L) e mine-

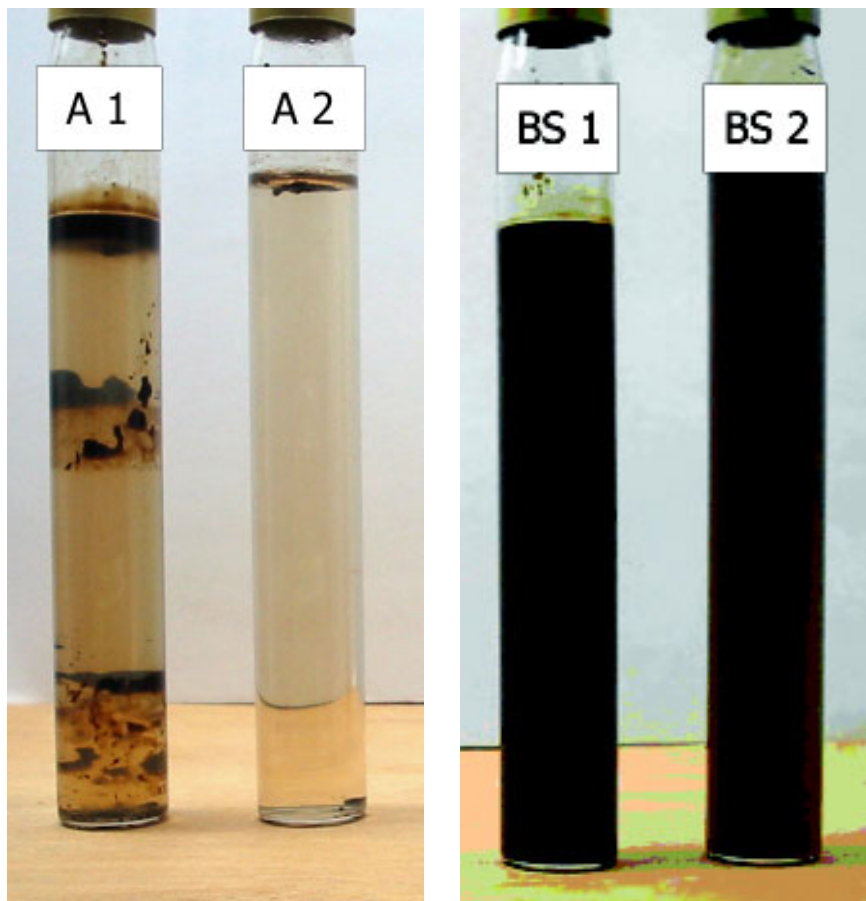


Figura 5. Águas de lavagem da areia impregnada com petróleo. A1-A2: água; BS1-BS2: solução biosurfatante 1mg/mL.

rais como P, K, Mg, Mn, S, Fe, Cu, Zn, Ca (Cereda, 1994). Segundo Cooper *et al.* (1981), os sais minerais, principalmente Fe e Mn, são fatores nutricionais importantes para a produção de surfactantes por linhagens de *Bacillus*. A presença desses minerais, além de fontes de carbono e nitrogênio, seja, provavelmente, o principal motivo de haver maior produção de biosurfatantes nesse resíduo.

Em adição à tensão superficial, a estabilização de emulsões é frequentemente utilizada como um indicador da atividade superficial (Abu-Ruwaida

*et al.*, 1991). A capacidade emulsificante do biosurfactante obtido em manipueira pelo isolado LB5a foi avaliada através do índice E<sub>24</sub> com diferentes hidrocarbonetos (Tabela 2). Os índices obtidos (60%-80%) revelam alta especificidade do biosurfactante contra todos os hidrocarbonetos testados, formando emulsões estáveis do tipo A/O (Figura 3). O composto obtido possui potencial para uso na biorremediação, recuperação de petróleo e emulsificação de óleos e gorduras.

Com vistas a avaliar a capacidade do biosurfactante produzido em

manipueira pelo isolado LB5a em remover petróleo de areia contaminada, procedeu-se a um experimento ilustrado nas Figuras 4 e 5, onde se observa que a areia tratada com solução de biosurfatante apresenta aspecto mais claro e as respectivas águas de lavagem demonstram maior capacidade de recuperação do petróleo em relação ao tratamento sem tensoativo.

## Conclusões

Entre os resíduos agroindustriais testados, a manipueira foi que demonstrou a maior potencialidade para uso como substrato alternativo na produção de biosurfatantes por isolados de *Bacillus* sendo que o composto obtido apresentou capacidade para uso em biorremediação de poluentes e em recuperação de petróleo.

## Referências Bibliográficas

- ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and evaluation. **Acta Biotechnologica**, 11(4): 315-324, 1991.
- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, 17: 1367-1371, 2001.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, 31: 488-494, 1968.
- BANAT, I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, 198: 44-47, 2000.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 152: 41-52, 1999.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50: 520-529, 1998.
- CEREDA, M. P. **Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil**. São Paulo, Paulicéia, 1994. 174p.
- COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, 42: 408-412, 1981.
- DANIEL, H. J.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. **Biotechnology Letters**, 20: 1153-1156, 1998.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61(1): 47-64, 1997.
- DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Production of biosurfactants**. In: Biosurfactants: production, properties, applications. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 65-97, 1993.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, 75: 235-240, 2000.
- HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI40044 from waste frying oils. **Journal Applied Microbiology**, 88: 379-387, 2000.
- KOCH, A.; REISER, K. J.; KAPELLI, O.; FIECHTER, A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *P. aeruginosa* and their application in biosurfactant production. **Biotechnology**, 6: 1335-1339, 1988.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 74 (7): 887-889, 1997.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources – a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2: 237-241, 1999a.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2(3): 367-372, 1999b.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58: 428-434, 2002.
- MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A.; ROBERT, M.; ESPUNY, M. J.; ANDRES, C. De; GUINEA, J. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, 43: 1-6, 1993.
- MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 71 (1): 61-64, 1994.
- MERCADE, M. E.; MONLEON, L.; ANDRES, C. De; RODON, I.; MARTINEZ, E.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, A. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. **Journal Applied Bacteriology**, 81: 161-168, 1996.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52: 154-162, 1999.
- SANTOS, C. F. C.; PASTORE, G. M.; DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P. Produção de biosurfactantes por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Boletim Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 33 (2): 157-161, 1999.
- SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 27: 110-116, 1987.
- VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R. M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, 25: 289-297, 1997a.
- VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(1): 44-49, 1997b.