



Produção e Aplicações de Biossurfactantes

Laboratório de Microbiologia
Industrial

Prof. Dr. Jonas Contiero

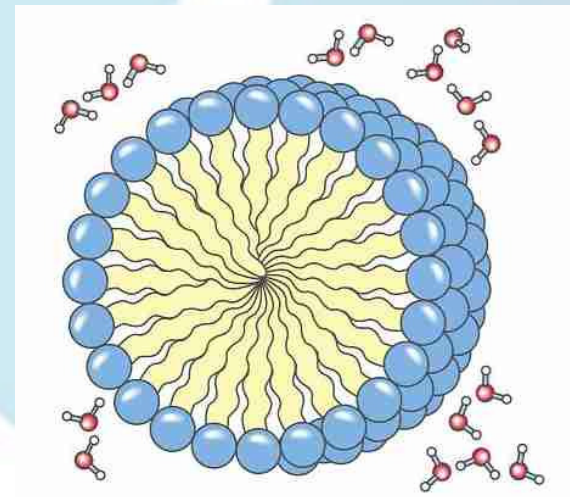
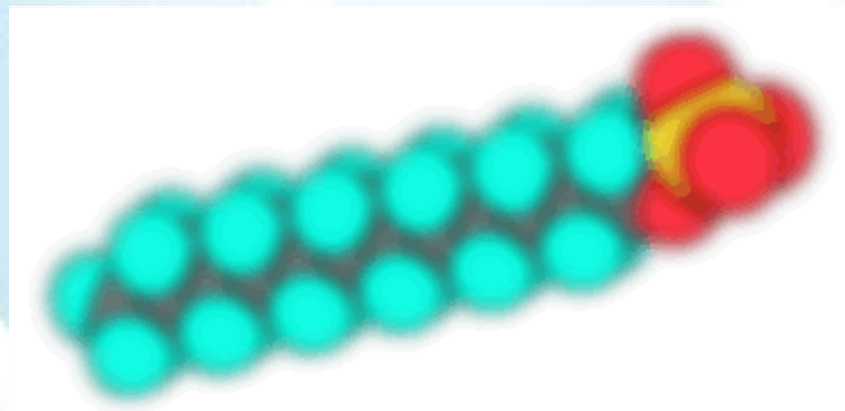
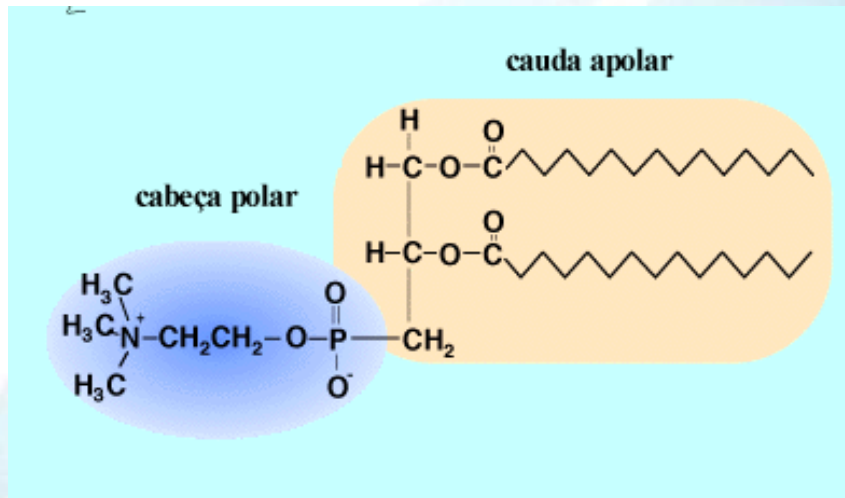
TÓPICOS A SEREM ABORDADOS

- **Surfactantes**
- **Biossurfactantes**
- **Classes e Microrganismos produtores**
- **Propriedades**
- **Biossurfactantes x Surfactantes**
- **Produção de Biossurfactantes**
- **Aplicações**
- **Pesquisas desenvolvidas e em desenvolvimento**

Introdução

Surfactantes:

- compostos químicos, utilizados em diversos setores industriais;
- maioria sintetizados a partir de derivados de petróleo;
- até 1965, os surfactantes presentes nos detergentes não eram biodegradáveis;
- são moléculas anfipáticas: uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica.
- os surfactantes diminuem a tensão superficial da água.
- após a CMC, as moléculas de surfactante, na solução, passam a se agregar sob a forma de micelas.



Molécula anfipática

Surfactantes

- Molécula anfipática;



- **Atividade de superfície:** Propriedades que os biosurfactantes conferem: **Diminuição da tensão superficial, tensão interfacial e formação de microemulsões**
- **Origem;**

Biossurfactantes

Compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras.

MOTIVAÇÃO PARA A PESQUISA



Vazamentos de petróleo



Vazamentos em postos de combustíveis



Acúmulo de resíduos

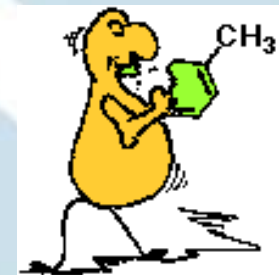
DESAFIO

Produto de Origem Microbiana

Biorremediação de Hidrocarbonetos

Vantagens Ecológicas, Sociais e Econômicas

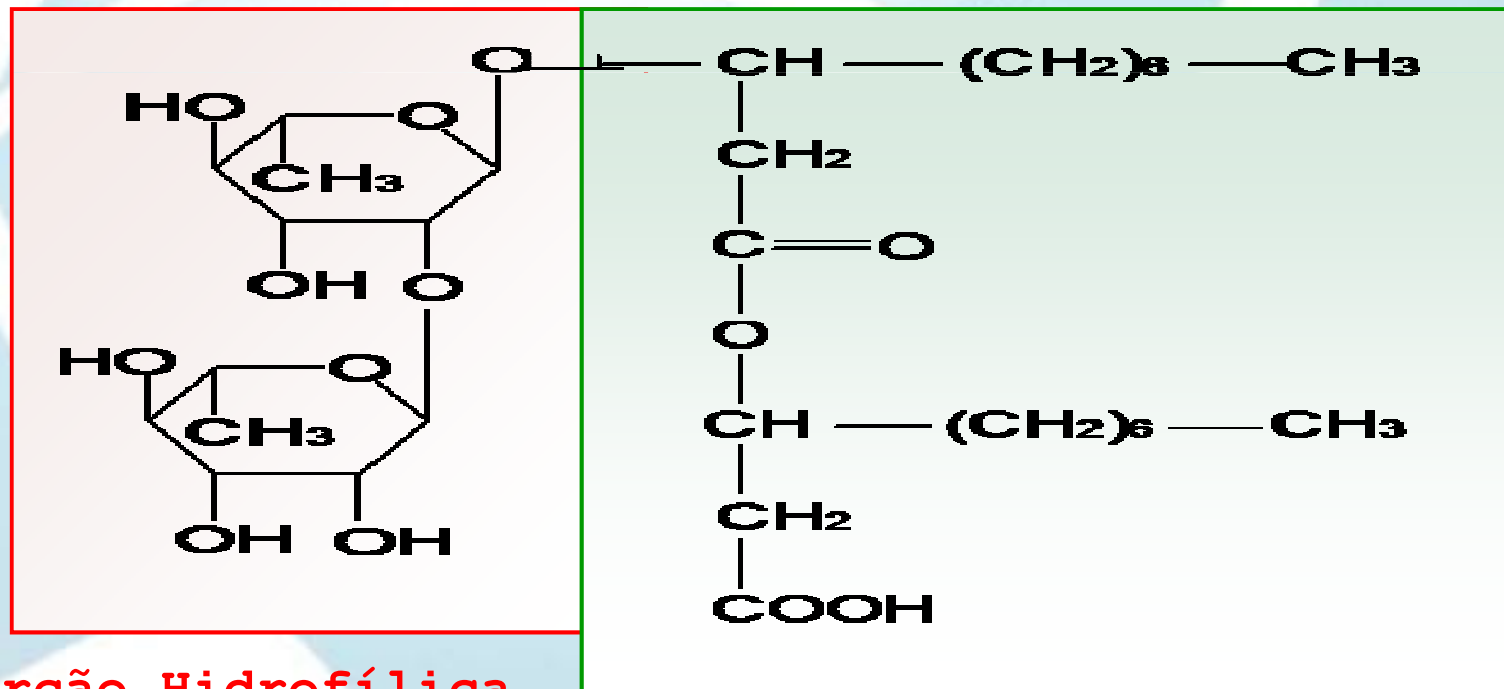
Biosurfactantes



Biossurfactantes

Definição: biotensoativos ou biossurfactantes são moléculas anfipáticas, com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, com habilidade de causar emulsificação em uma mistura de água-óleo

Estrutura de um biossurfactante (BOGNOLO, 1999; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998)



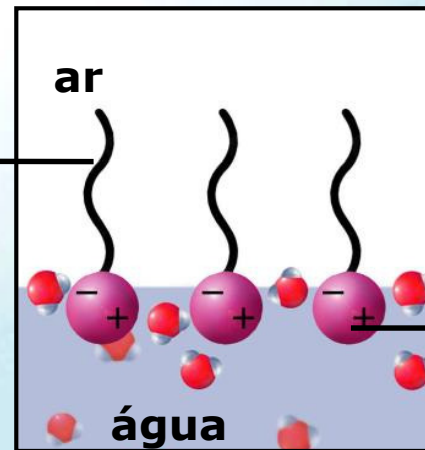
Porção Hidrofílica

Porção Hidrofóbica

Porção hidrofílica: aminoácidos [glutamato, aspartato, lisina, ornitina e arginina] ou peptídeos [consistindo de aminoácidos hidrofílicos], carboidratos, fosfato, ácido carboxílico, álcool, etc.

Porção hidrofóbica: Ácidos graxos saturados ou insaturados

- ác. graxos de cadeia longa



- Carboidratos
- Aminoácidos
- Grupo fosfato
- Álcool

Classes de Biosurfactantes

- Ácidos graxos hidroxilados e ligados por ligações cruzadas (ácido micólico)
- Glicolipídeos
- Complexo Polissacarídeo-lipídeo
- Lipoproteínas-lipopeptídeos
- Fosfolipídeos
- Superfície celular completa

Biossurfactantes

1.2 Classes e microrganismos produtores

Biotensoativo	Microrganismo
Glicolipídios	
<u>Ramnolipídios</u>	<u><i>Pseudomonas sp</i></u>
	<i>Burkholderia sp</i>
Trealolipídios	<i>Rhodococcus erythopolis</i>
	<i>Nocardia erythopolis</i>
	<i>Mycobacterium sp</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis sp</i>
Manosileritritol	<i>Candida antartica</i>

Fonte: DESAI e BANAT (1997 e 2000)

Biossurfactantes

1.2 Classes e microrganismos produtores

Biotensoativo	Microrganismo
Lipopeptídios e Lipoproteínas	
Peptidolipídio	<i>Bacillus lincheformis</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Ácidos graxos e fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Anthrobacter calcoaceticus</i>
Manana lipídio proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>

Fonte: DESAI e BANAT (1997 e 2000)

Tipos de biosurfactantes

Glicolipídeos

Lipídeos-trealose [Dissacarídeo trealose ligado ao C6 e C6' do ácido micólico] associado a estrutura da membrana da parede de muitas espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Corynebacterium*. Redução da **tensão superficial** para 25-30mN/m e **tensão interfacial** por volta de 1 mN/m

Ramnolipídeos [uma ou duas moléculas de ramnose ligada a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanoico] Produzido por *Pseudomonas aeruginosa*. Redução da **tensão superficial** para 25-30mN/m e **tensão interfacial** por volta de 1 mN/m

Soforolipídeos [consiste de um carboidrato dimérico da sofrose ligado a uma cadeia longa de ácido hidroxicarboxílico]. Produtores: *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum*, *T. apicola* e *Candida bogoriensis* **Tensão interfacial:** 40-5mN/m **Não é bom agente emulsificante**

Fofolipideos e ácidos graxos: Produzido por certas bactérias e leveduras quando do crescimento sobre n-alcenos. *Thiobacillus thiooxidans*, *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 [crescendo sobre hexadecano e óleo de oliva, produz de 405-80% w/w de lipídeo

Lipopeptideo/lipoproteínas: Antibiótico decapeptideo [Gramicidina], *Bacillus brevis* Antibiótico lipopeptideo [Polimixina], *Bacillus polymixa*. Inclui-se aqui também *T. thiooxidans*, produtor de cerilipina, *Agrobacterium tumefaciens* e *Streptomyces sioyaensis*

Surfactina: lipopeptideo produzido por *Bacillus subtilis* Esse biosurfactante é bem conhecido, podendo diminuir a tensão superficial de 72mN/m para 27,9 mN/m quando na concentração de 0,005%. Limite de seu uso: habilidade de lisar células do sangue

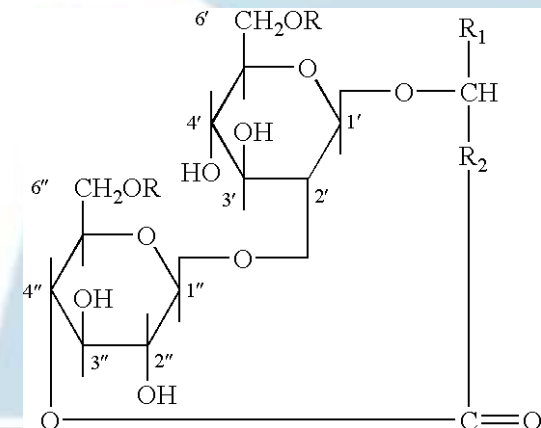
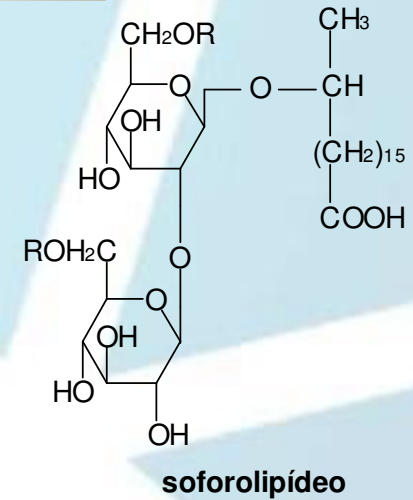
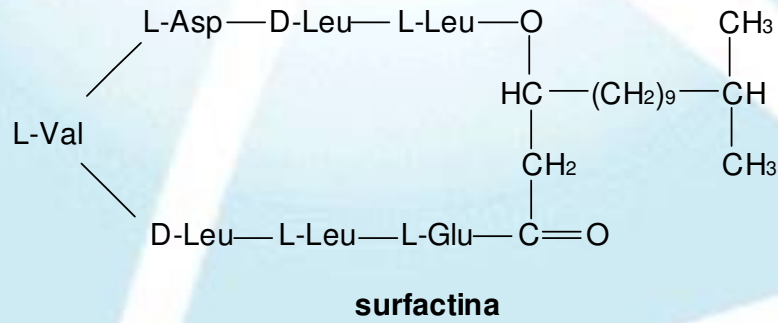
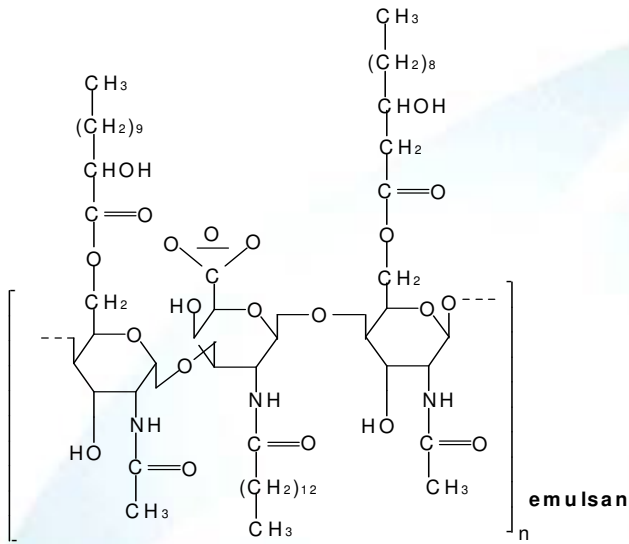
Biosurfactante BL-86 : produzido por *B. licheniformis*, reduz tensão supreficial para 27 dinas/cm e interfacial entre água e n-hexadecano para 0,36 dinas/cm

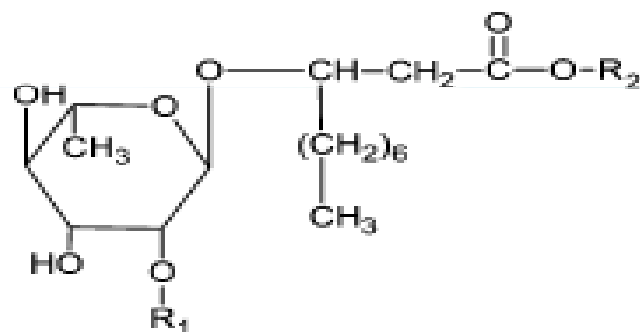
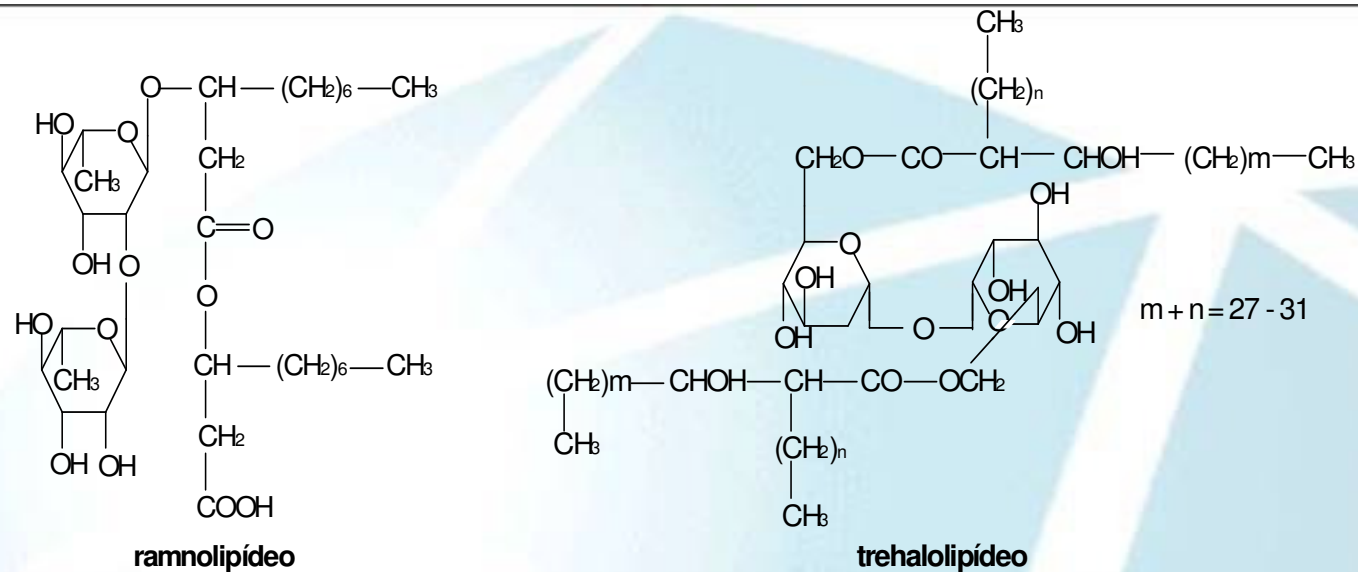
Biosurfactantes poliméricos: Características: alta massa molar, alta viscosidade, resistência a tensão e força de cisalhamento
Exemplos: Emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1
Não reduz a tensão apreciavelmente, mas atua como um agente emulsificante efetivo para hidrocarbonetos em água [0,001%-0,01%]

Biodespersan: produzido por *A. calcoaceticus* O componente ativo é um heteropolissacarídeo anionico, com massa molar de 51.400

Liposan : produzido por *C. lipolytica*, é um emulsificador solúvel em água, com composição de 83% de carboidrato e 17% proteína. A porção carboidrato contém: glicose, galactose, galactosamina e ácido galacturônico

Surfactantes particulados: Acumulo de vesículas de membrana extracelular, contendo proteína, fosfolipídeos e polissacarídeos.
Produtores : *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas salmonicids*, etc





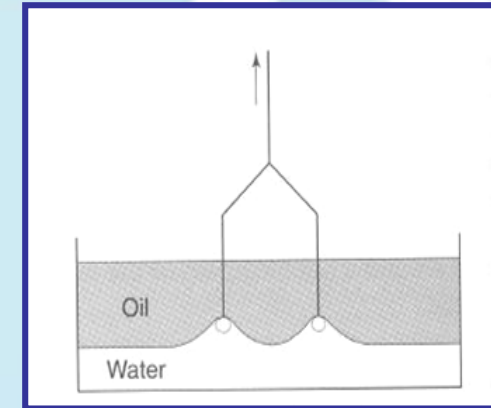
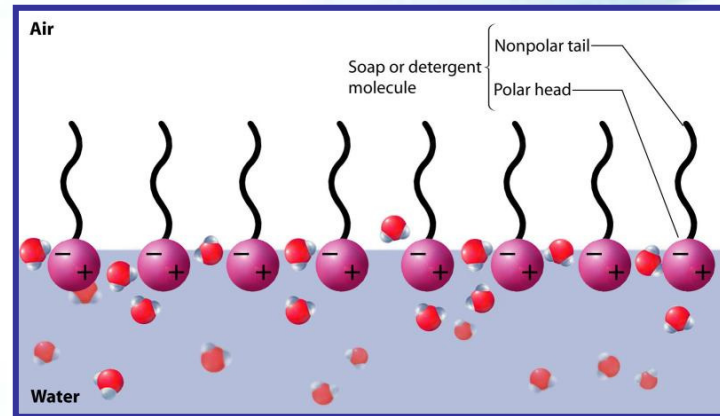
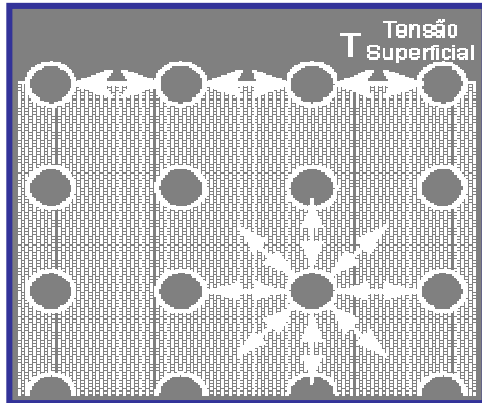
Rhamnolipid type	R ₁	R ₂	Designation
Rha ₂ C ₁₈ C ₁₀	L- α -rhamnopyranosyl	β -hydroxydecanoic acid	RL1
RhaC ₃₀ C ₁₀	H	β -hydroxydecanoic acid	RL2
Rha ₂ C ₁₀	L- α -rhamnopyranosyl	H	RL3
RhaC ₁₀	H	H	RL4

Figure 1. Chemical structure of the main rhamnolipid homologues.

Estructuras químicas de alguns biosurfactantes

Biossurfactantes

➤ Propriedades (Desai e Banat, 1997)



Redução das tensões
superficial e
interfacial

Emulsificação

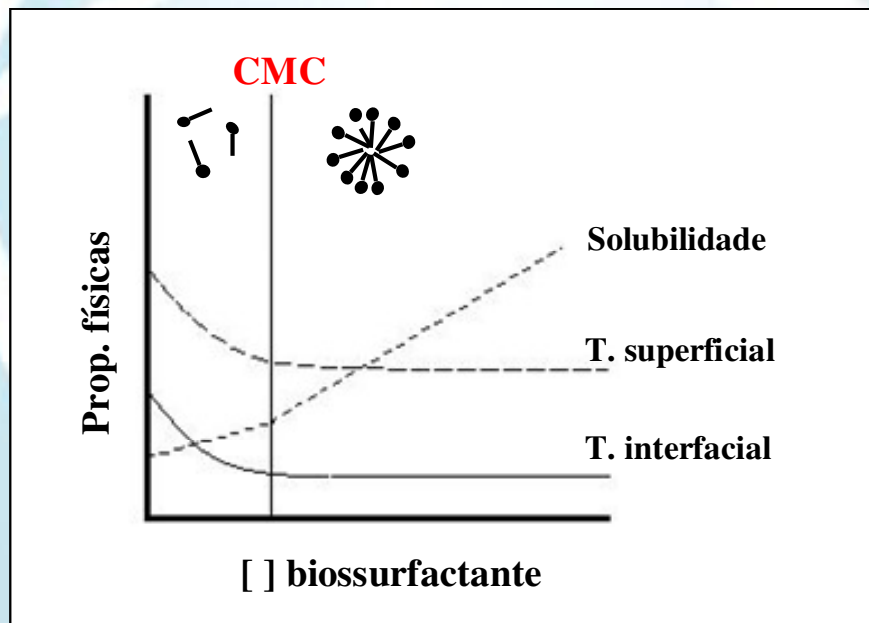
Solubilização

Detergência

Biossurfactantes

➤ **Propriedades** (Desai e Banat, 1997)

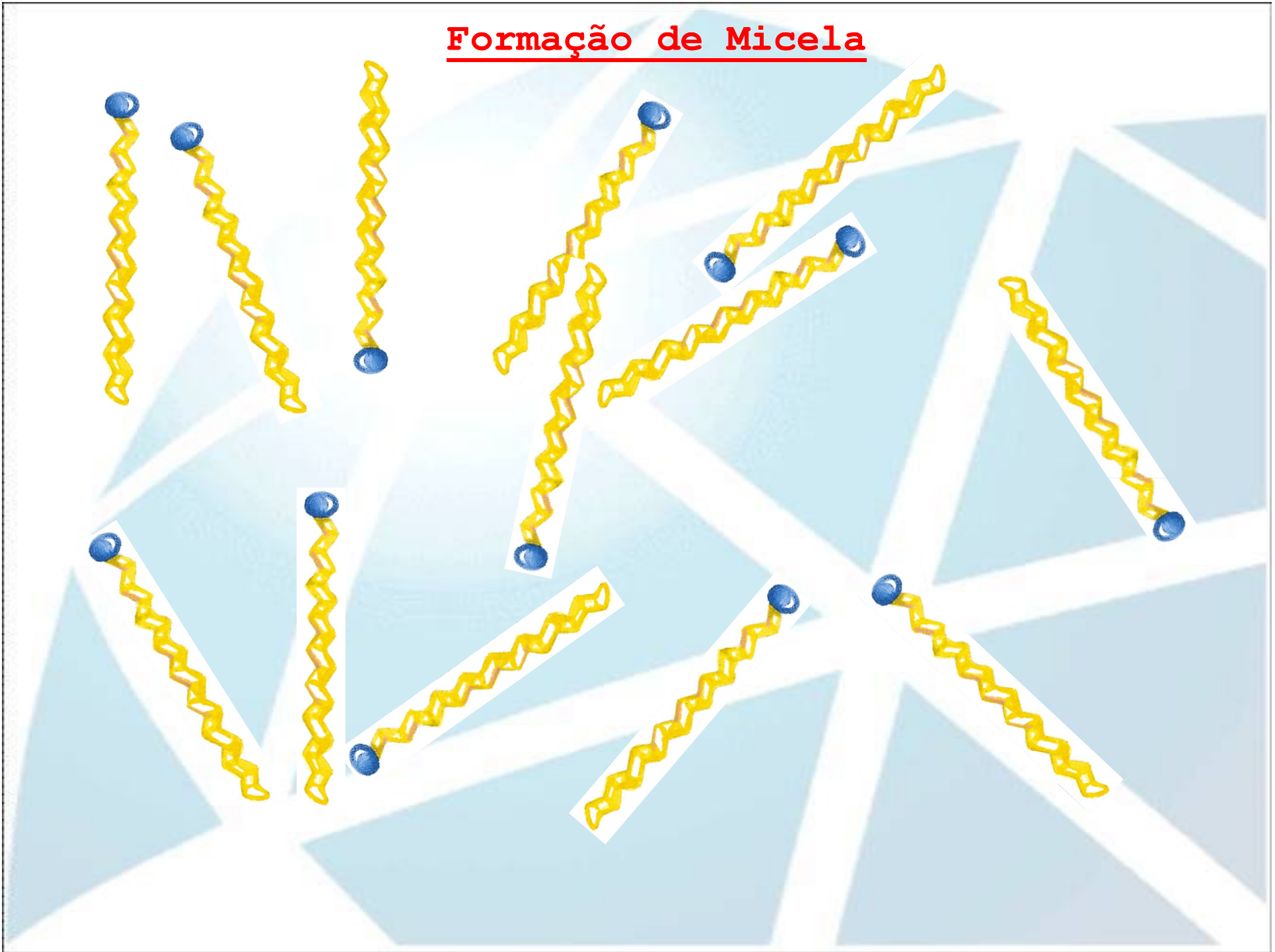
- Habilidade em formar micelas
- Concentração Micelar Crítica



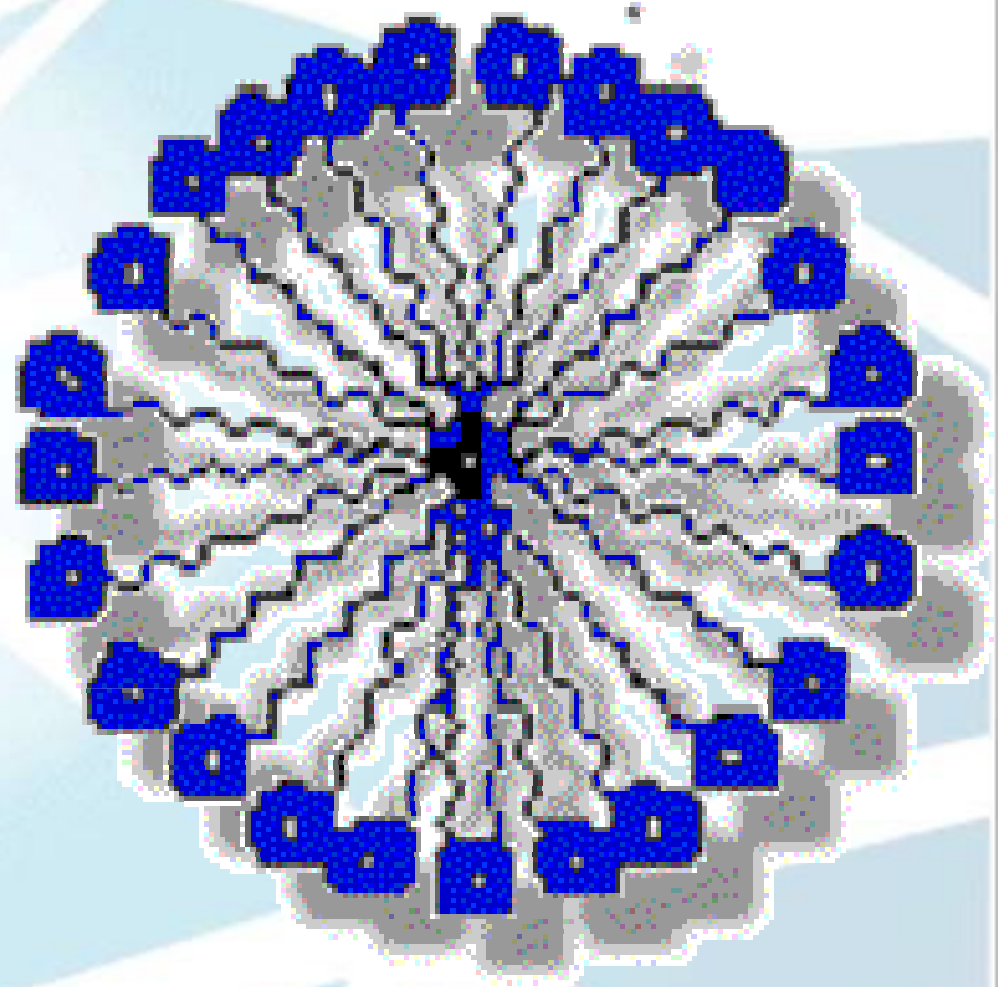
Ramnolipídeos

CMC - 15-200 mg/L

Formação de Micela



Formação de Micela



C.M.C.

Concentração Micelar Crítica

Biossurfactantes x Surfactantes

Aspectos Positivos

- são compostos biodegradáveis;
- não são tóxicos ao ambiente;
- possuem maior seletividade e atividade específica;
- continuam ativos sob condições extremas de pH, temperatura e salinidade;
- são produzidos a partir de fontes renováveis.

Biossurfactantes x Surfactantes

Entrave à ampla utilização
de Biossurfactantes

\$

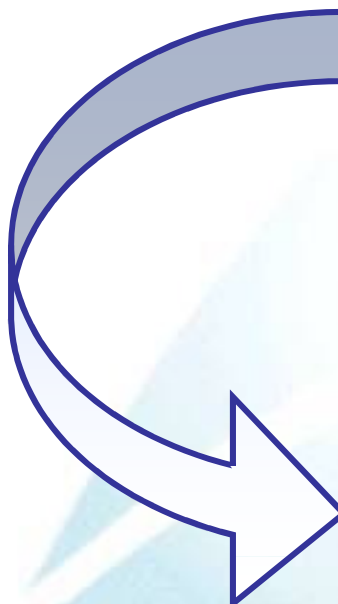
Custos de produção

Seleção de linhagens
altamente produtoras

Uso de engenharia
genética

Matéria-prima de
baixo custo

Otimização do
processo (reatores)



Produção de Biossurfactantes

Matéria-prima	Microrg. (rend. g/L)
Óleo residual de fritura	<i>P. aeruginosa</i> (2,7)
Efluente do processamento de batata	<i>Bacillus subtilis</i>
R.do process. óleo soja	<i>P. aeruginosa</i> (11,72)
Água de manipueira	<i>B.Subtilis</i> (2,2 - 3,0)
R.do proces. óleo giras.	<i>P. aeruginosa</i> (16,0)
R.de refinaria de óleo	<i>C. antarctica</i> / <i>C. apicola</i> (10,5/13,4)
Resíduo de destilaria	<i>P. aeruginosa</i> (0,92)

Fonte: Mukherjee et al., (2006)

Tabela 2 - Matéria-prima de baixo custo utilizada para a produção de biossurfactantes

Resíduos/ matéria-prima de baixo	Tipo de biossurfactante	Linhagem microbiana (Rendimento máximo em g.l ⁻¹)	Referência
Óleo de Canola	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas</i> DSM 2874 (45)	Trummler <i>et al.</i> , (2003)
Óleo de Babassu	Soforolipídios	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055	Vance-Harrop <i>et al.</i> , (2003)
Óleo de milho	Soforolipídios	<i>C. bombicola</i> ATCC 22214 (400)	Pekin <i>et al.</i> , (2005)
Óleo de soja e girassol	Ramnolipídios	<i>P.aeruginosa</i> DS10-129 (4,31/2,98)	Rahman <i>et al.</i> , (2002)
Óleo de girassol	Lipopeptídio	<i>Serratia mercenscens</i>	Ferraz <i>et al.</i> , (2002)
Óleo de soja	Manosileritritol	<i>Cândida</i> sp. SY16 (95)	Kim <i>et al.</i> , (2006)
Óleo residual de fritura	Ramnolipídios	<i>P.aeruginosa</i> 47T2 (2,7)	Haba <i>et al.</i> , (2000)
Soapstock (óleo de soja)	Ramnolipídios	<i>P.aeruginosa</i> LBI (11,72)	Nitschke <i>et al.</i> , (2005)
Soapstock (óleo de girassol)	Ramnolipídios	<i>P.aeruginosa</i> LBI (16)	Benincasa <i>et al.</i> , (2002/04)
Resíduo da refinaria de óleo	Glicolipídio	<i>C. antártica</i> e/ou <i>C. apícola</i> (10,5/13,4)	Bednarski <i>et al.</i> , (2004)
Soapstock (óleo de soja)	Ramnolipídios	<i>P.aeruginosa</i> AT10 (9,5)	Abalos <i>et al.</i> , (2001)
Res. Destilaria/ S. de queijo	Ramnolipídios	<i>P.aeruginosa</i> BS2 (0,92)	Dubey e Juwarkar (2001/04)
Efluente do processamento de batata	Lipopeptídio	<i>Bacillus subtilis</i>	Thompson <i>et al.</i> , (2000/01); Noah <i>et al.</i> , (2002 e 2005)
Efluente do processamento de farinha de mandioca	Lipopeptídio	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e <i>B. subtilis</i> LB5a (2,2 – 3,0)	Nitschke e Pastore (2003, 2004 e 2006)

Fonte: MUKHERJEE *et al.*,(2006)

Matéria prima utilizada no LMI para produção de Biosurfactante

Borra de Petróleo

Elementos inorgânicos presentes na Borra

pH	%	Density g/mL	%							
	OM		N	Ca	Mg	S	Fe	Na	Al	C/N
7.20	63.85	1.03	0.53	0.29	0.11	0.32	0.69	0.13	0.71	66.93
ppm										
P total	Mn	Cu	Zn	B	Co	Ba	Cd	Cr	Ni	Pb
908	138	27.5	683	50	2.5	52.11	0.28	57.81	14.14	13.23

Borra de Óleo de Soja

Composition of fatty acids from oil refinery waste used as carbon source by *P. aeruginosa* LBI

		% (w/w)
FATTY ACID COMPOSITION	R. OIL WASTES (SOAPSTOCK)	
C16 palmitic		16.66
C18 stearic		3.58
C18:1 oleic		22.9
C18:2 linoleic		50.28
C18:3 linilenic		4.54

Table 2. Utilization of Fatty Acids from Oil Refinery Wastes by *P. aeruginosa* LBI after 144 h of Incubation

fatty acid	% consumed				
	cottonseed	babassu	corn	soybean	palm
C12 lauric		43.0			57.40
C14 miristic	47.22	57.66			70.0
C16 palmitic	10.64	57.44	68.44	75.97	66.47
C18 stearic	9.26	27.36	52.59	42.87	42.93
C18:1 oleic	7.71	46.09	47.98	67.25	60.23
C18:2 linoleic	15.55	36.20	42.34	82.20	52.47
C18:3 linolenic	19.15		55.22	100	74.20

Nitschke et al, 2005 Biotechnology Progress

Composição do óleo de fritura

Ácido Graxo		(%)
C10:0	Cáprico	0,03
C12:0	Láurico	0,03
C14:0	Mirístico	0,47
C16:0	Palmítico	14,83
C16:1	Palmitoléico	0,67
C18:0	Estearico	4,51
C18:1 Trans	Elaídico	0,97
C18:1	Oléico	30,15
C18:2 Trans	Linoelaídico	0,35
C18:2	Linoléico	42,99
C18:3 Trans	Translinolênico	0,71
C18:3	Linolênico	3,72
C20:0	Araquídico	0,15
C20:1	Gadoléico	0,27
C22:0	Behênico	0,13

Production and properties of the rhamnolipids obtained from native oils

Oil type	Biomass (mg ml ⁻¹)	Rhamnolipid (g l ⁻¹)	Final broth pH	ST (mN m ⁻¹) ^a	IT (mN m ⁻¹) ^a	CMC (mg l ⁻¹)
Andiroba	1.53	8.1	7.6	30.26	1.7	58.16
Babassu	1.36	6.8	7.5	30.16	1.8	55.57
Buriti	1.25	2.9	8.5	31.5	1.5	119.87
Brazilian Nut	1.37	9.9	7.3	30.16	1.3	107.43
Cupuaçu	1.29	6.6	8.5	30.4	1.2	85.13
Passion Fruit	1.44	9.2	6.4	29.8	1.8	163.44

^a Against hexadecane, ST: surface tension; IT: interfacial tension.

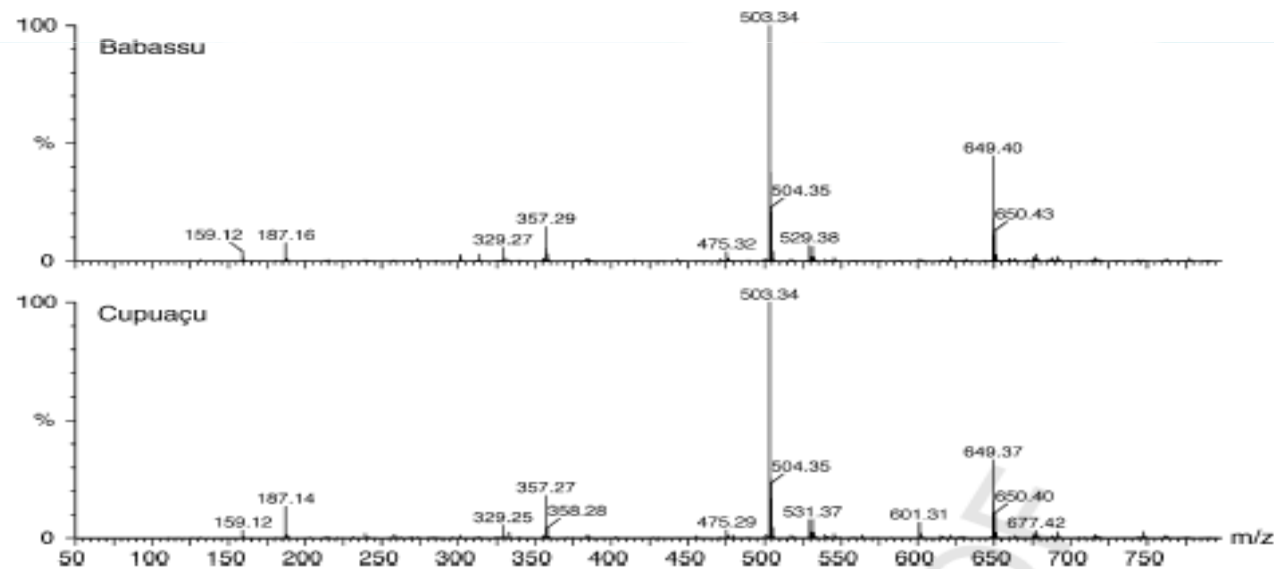


Fig. 2. ESI mass spectrum for the rhamnolipids mixtures produced by *P. aeruginosa* LBI using Babassu and Cupuaçu oils.

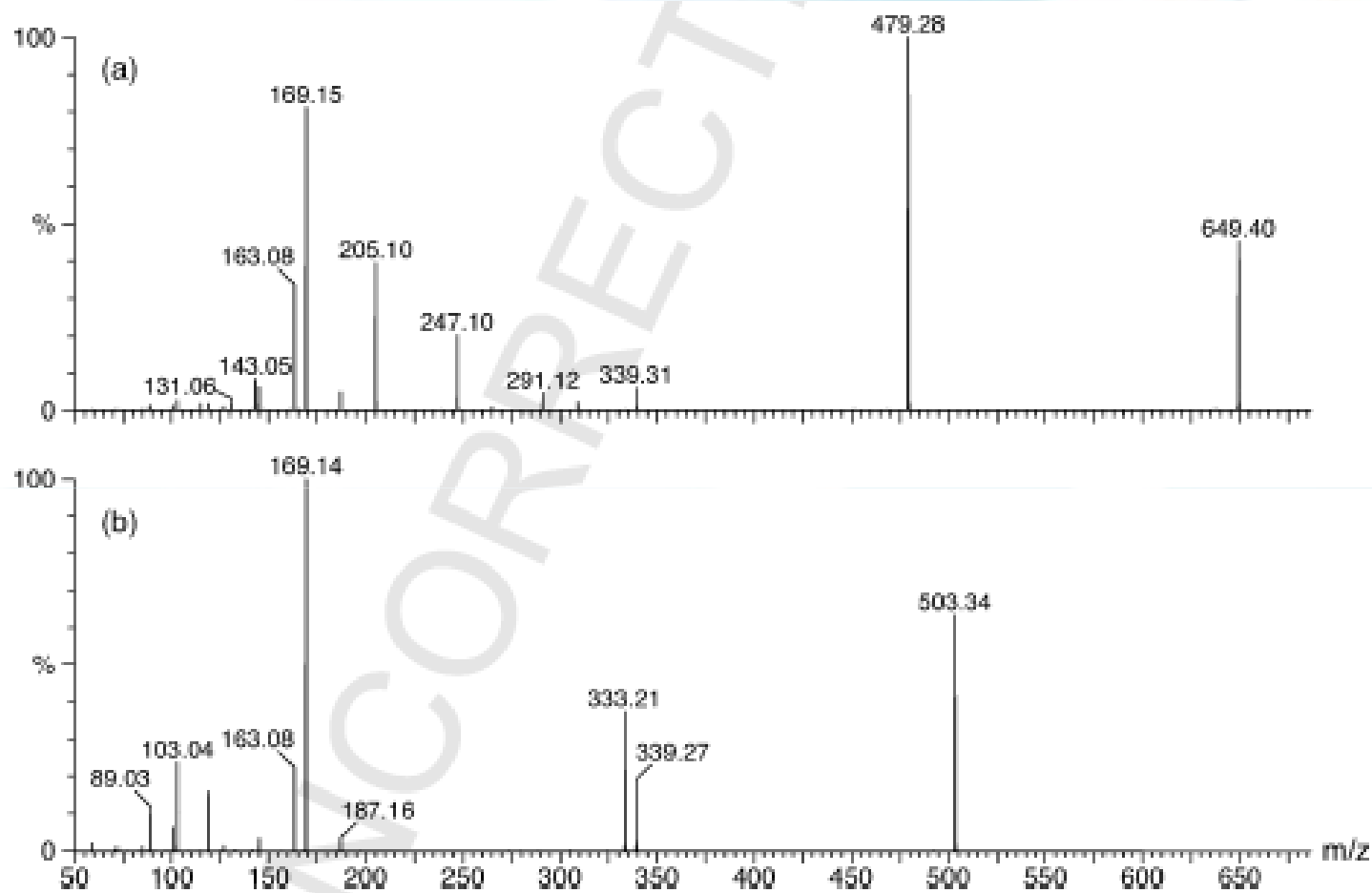


Fig. 3. ESI tandem mass spectra of: (a) $[Rha_2C_{10}C_{10}-H]^-$ of m/z 649 and (b) $[RhaC_{10}C_{10}-H]^-$ of m/z 503.

Table 3. Surface-Active Properties of Rhamnolipids Obtained from Oil Refinery Wastes

parameters	oil waste				
	cottonseed	babassu	corn	soybean	palm
ST ^a (mN/m)	33.86	30.08	30.96	26.92	31.76
CMC (mg/L)	86.79	210.77	43.21	51.56	40.19
IT ^a (mN/m)	13.35	16.15	2.40	1.25	4.20
E ₂₄ (%)	10.1	20.0	20.0	55.7	71.4
RL (g/L)	10.55	8.65	13.46	11.72	8.62

^a 0.1% aqueous solution.

Table 1. Surface-Active Properties of Rhamnolipids Obtained from *Pseudomonas* Strains^e

strain	rhamnolipid	ST (mN/m)	IT (mN/m)	CMC (mg/L)	ref
<i>P. aeruginosa</i> 47T2	RL mixture	32.8	1 ^a	108.8	22
<i>P. aeruginosa</i> AT10	Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	28.8	nd	106	25
<i>P. aeruginosa</i> AT10	M ₈ mixture ^c	27.3	nd	234	25
<i>P. aeruginosa</i> AT10	M ₇ mixture ^d	26.8	nd	150	25
<i>P. aeruginosa</i> LBI	RL mixture	24.0	1.31 ^b	120	21
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	RhaC ₁₀ C ₁₀	25.0	0.2 ^a	11	15
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	25.0	1.0 ^a	11	15
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RhaC ₁₀ C ₁₀ + Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	26.0	<1.0 ^b	20	9
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RL mixture	28.0	<1.0 ^b	20	9
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RhaC ₁₀ C ₁₀	26.0	4.0 ^b	20	9
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	27.0	<1.0 ^b	10	9
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	Rha ₂ C ₁₀	30.0	<1.0 ^b	200	9
<i>Pseudomonas</i> sp. DSM2874	RhaC ₁₀	25.0	<1.0 ^b	200	9
<i>P. aeruginosa</i> UG-2	RhaC ₁₀ C ₁₀ + Rha ₂ C ₁₀ C ₁₀	31.0	nd	53	19

^a against kerosene. ^b against hexadecane. ^c RhaC₁₀C₁₀ + Rha₂C₁₀C₁₂ + RhaC₁₀C₁₂ + RhaC_{12:1}C₁₀ + RhaC_{12:2} + RhaC_{8:2}. ^d Rha₂C₁₀C₁₀ + RhaC₁₀C₁₀ + Rha₂C₁₀C₁₂ + RhaC₁₀C₁₂ + RhaC_{12:1}C₁₀ + RhaC_{12:2} + RhaC_{8:2}. ^e ST, surface tension; IT, interfacial tension; CMC, critical micelle concentration.

Table 1 Summary of the experimental results obtained for investigating the hydrocarbon utilization by *P. aeruginosa* LBI:

Carbon source (%)	Surface tension mN/m	Surface tension reduction (%)	Biomass (g/L)	pH initial	pH final	Rhamnolipi (g/L)
Kerosene (20)	32	45	2.43	6.8	6.8	1.02
Diesel oil (30)	33	36.5	5.4	6.8	8.4	9.9
Crude oil (10)	36	37.7	2.0	6.8	7.0	1.4
Oil sludge (10)	36.3	27.4	4.0	6.8	6.9	1.08

Produção de Biossurfactantes

➤ Padrões de Produção (Sylddatk e Wagner, 1987)

- Produção associada ao crescimento;
- Produção sob condições limitantes de crescimento;
- Produção por células não proliferantes;
- Produção com adição de precursores.

BIOSSÍNTESE DE BIOSURFACTANTE

Biossurfactante: Duas porções: hidrofílica e hidrofóbica

Diversas vias metabólicas estão envolvidas na síntese desse dois compostos, utilizando enzimas específicas. Em muitos casos a primeira enzima na via metabólica do precursor é única e sofre regulação

1. De novo síntese das porções hidrofílicas e hidrofóbicas através de duas vias independentes seguida da ligação
2. De novo síntese da porção hidrofílica e a síntese da porção hidrofóbica é dependente do substrato
3. De novo síntese da porção hidrofóbica e a síntese da porção hidrofílica é dependente do substrato

Regulação

1. Por indução: Em geral microrganismos produzem biosurfactantes quando crescem em meios contendo substratos insolúveis em água. Utilização de indutores como longas cadeias de ácidos graxos, hidrocarbonetos ou glicerídeos no meio de crescimento de *T. magnoliae* aumentava a produção de surfactolipídeos.
2. Regulação catabólica: Ocorre através da glicose ou metabólitos primários. *Actinobacter calcoaceticus* e *A. paraffineus* não produzem biosurfactante quando crescidas em ácidos orgânicos e glicose respectivamente.
3. Efeito da fonte de Nitrogênio e cátions multivalentes. Sais de amônia e de uréia tem sido citados como fonte preferida no caso de *A. paraffineus*. Em *Pseudomonas aeruginosa* RC-II amônia e glutamina em alta concentração reprime a síntese de biosurfactante.

A limitação de cátions multivalentes também causa superprodução de biosurfactante em *Pseudomonas spp.*

Síntese de ácido graxo



Ácido β -hidroxidecanóico

3;4



β hidroxidecanoil--ácido β hidroxidecanóico

Gliconeogênese



D-glicose



TDP-glicose



TDP-Ramnose



L-ramnosil- β -hidroxidecanoil-ácido β -hidroxidecanóico

2;4



L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -ácido β -hidroxidecanóico

2 – RH2
3 – RH3
4 – RH4

Produção de Biosurfactante

Produção de biosurfactante via fermentação:

Dependendo da natureza do biosurfactante e do microrganismo produtor, a produção pode ocorrer como:

1. Produção associada ao crescimento – Parâmetros importantes: Tipo de Fonte de carbono, Tipo de adição de Nitrogênio, Velocidade de agitação, transferência de oxigênio
2. Produção sob condições de crescimento limitante – Quando a concentração de Nitrogênio é limitante. A razão C:N no meio tem um efeito importante na produção de biosurfactante. A limitação de cátions bivalentes como Mg^{++} , Fe^{++} ou Ca^{++} também favorece a formação de biosurfactante
3. Produção por “Resting/no growing cells” – As células não se multiplicam, mas continuam a produção
4. Produção associada com aumento de um precursor.

Adição de precursores causa um grande aumento na produção de biosurfactante

Obtenção do Produto: A escolha de um método para obtenção de um biosurfactante depende da carga iônica, solubilidade em água, e se o produto está ligado à célula ou é extracelular

Métodos:

Extração por solvente: clorofórmio-metanol, diclorometano-metanol, butanol, acetato de etila, pentano e hexano. No caso de *Torulopsis bombicola*, *T. apicola*, *T. petrophilum* carvão é adicionado ao meio fermentado livre de célula e após filtração o composto é desorvido por acetato de etila resfriado, o qual é removido sobre pressão reduzida e o glicolípídeo dissolvido em etanol aquecido e cristalizado.

Cristalização: É possível colher cristais do sobrenadante de cultivo através da adição de ácido seguido por incubação a baixa temperatura.

Precipitação : Sulfato de amônia, ácido, etanol-ácido acético e acetona

Sulfato de amônia: Emulsan e biodispersan produzidos por *Acinetobacter* spp.

Precipitação ácida: surfactina produzida por *Bacillus subtilis*

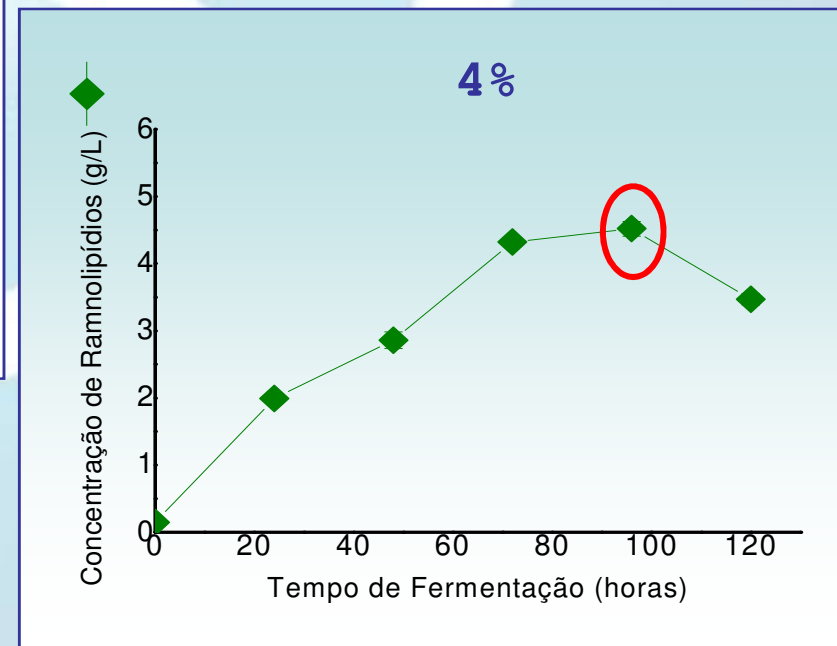
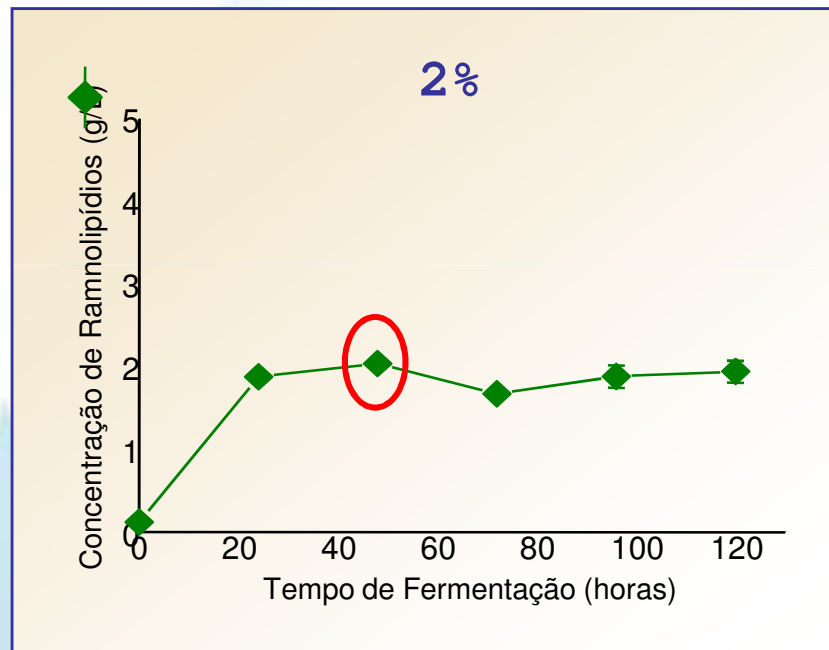
Acetona: biosurfactante produzido por *Pseudomonas* spp.

No caso de produção contínua, ocorre acidificação com HCl 2N, onde proteínas e lipídeos são precipitados, em seguida o biosurfactante é extraído do sobrenadante com diclorometano [surfactina]. Filtração com fluxo tangencial também pode ser utilizada

Produção de Biossurfactantes

➤ Fatores que afetam a produção (Fiechter, 1992; Jo Chu Chang, 2005)

- Fontes de Carbono

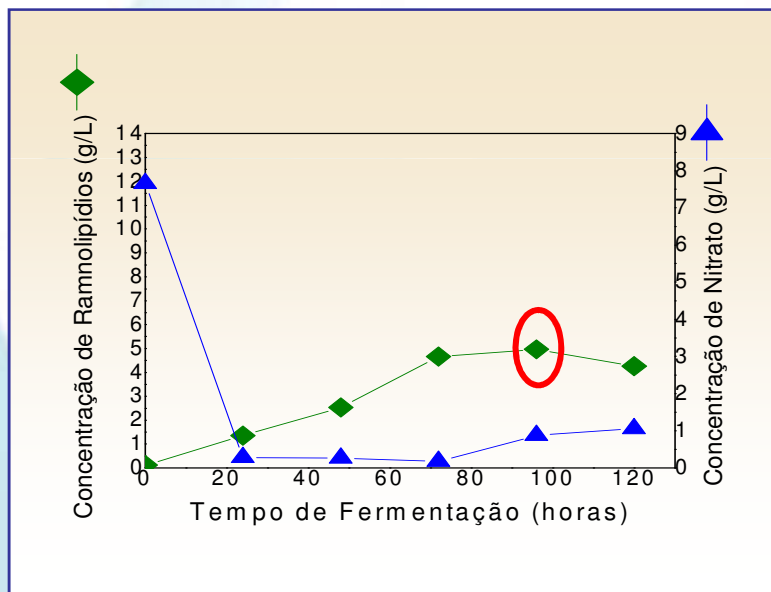


Produção de Biossurfactantes

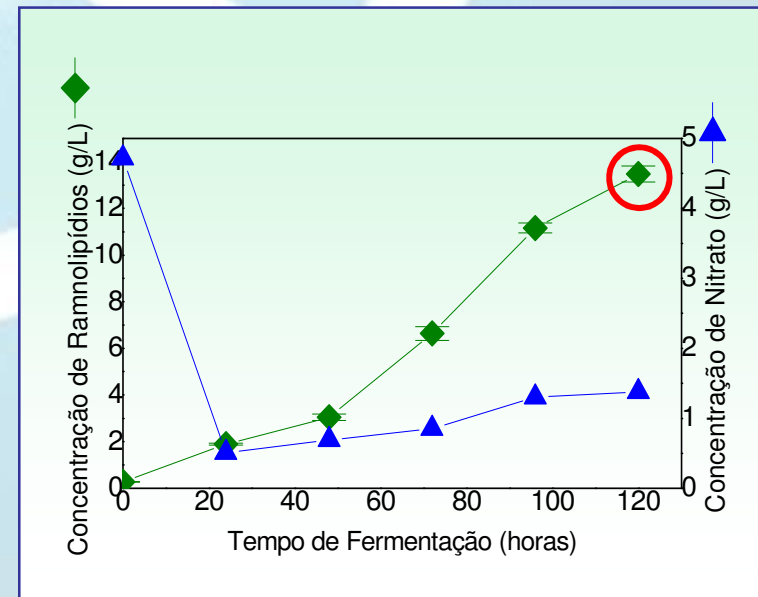
➤ Fatores que afetam a produção (Fiechter, 1992; Jo Chu Chang, 2005)

- Proporções C/N, C/P e cátions bivalentes

C/N 13



C/N 23

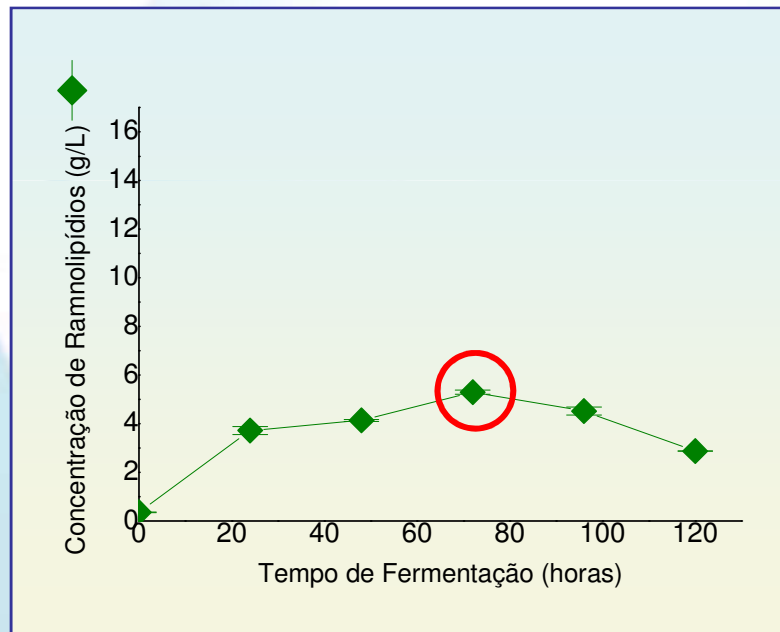


Produção de Biossurfactantes

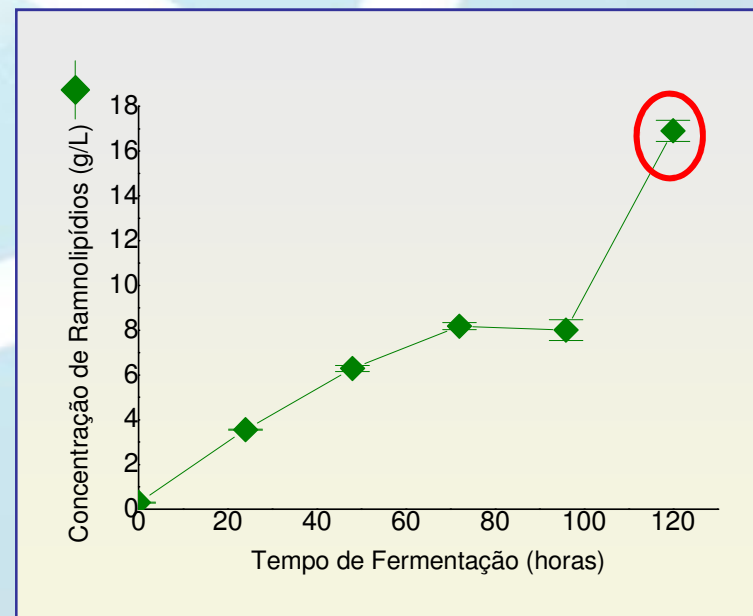
➤ Fatores que afetam a produção (Fiechter, 1992; Jo Chu Chang, 2005)

- Temperatura e pH

c/ controle



s/ controle

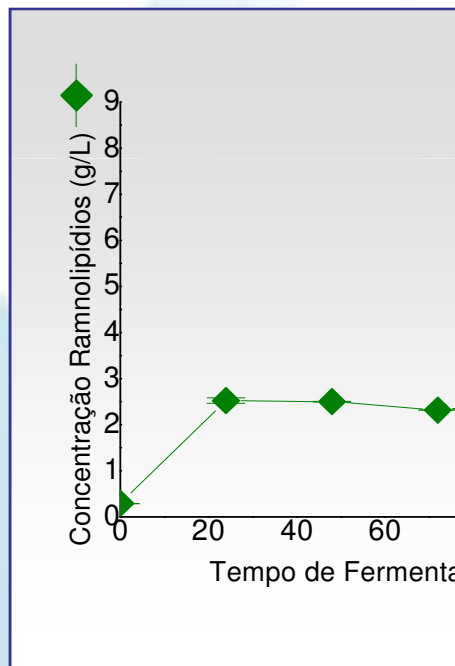


Produção de Biossurfactantes

➤ Fatores que afetam a produção (Fiechter, 1992; Jo Chu Chang, 2005)

- Agitação

500 rpm



100 rpm

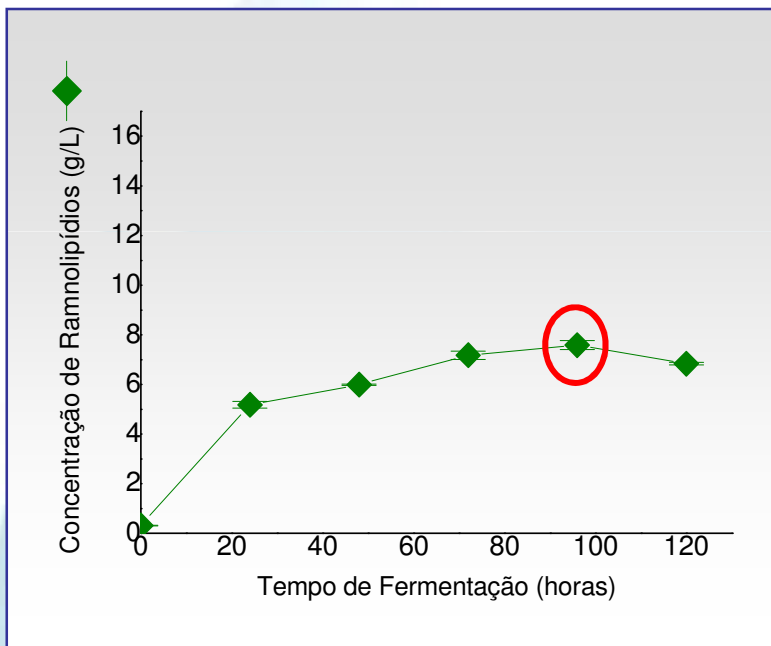


Produção de Biossurfactantes

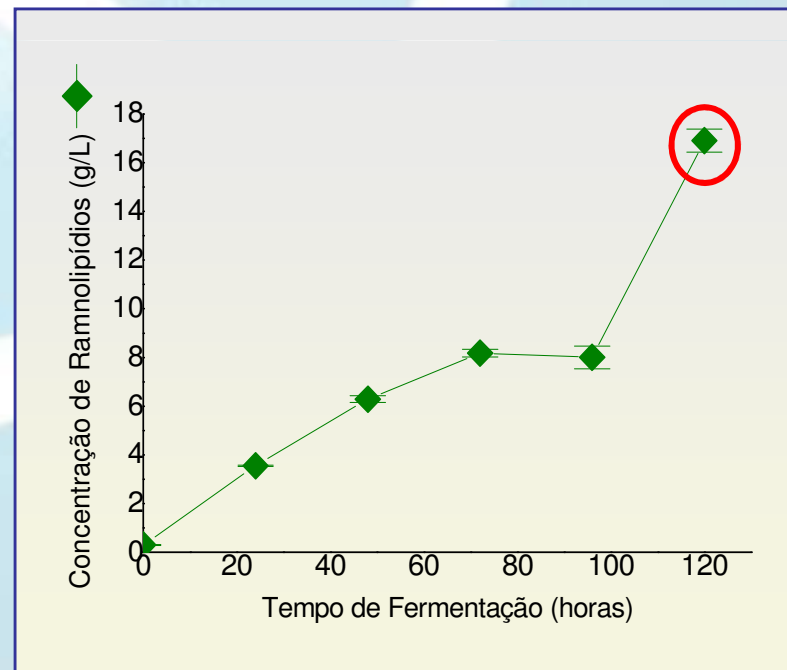
➤ Fatores que afetam a produção (Fiechter, 1992; Jo Chu Chang, 2005)

- Aeração

1,0 vvm



2,0 vvm




Produção de Biossurfactantes

Redução dos
custos de
produção

+

Aumento dos
rendimentos de
biossurfactante



Substituição dos
surfactantes químicos
por aqueles de origem
biológica

Aplicações (Abalos et al., 2001)

➤ Aplicações Terapêuticas



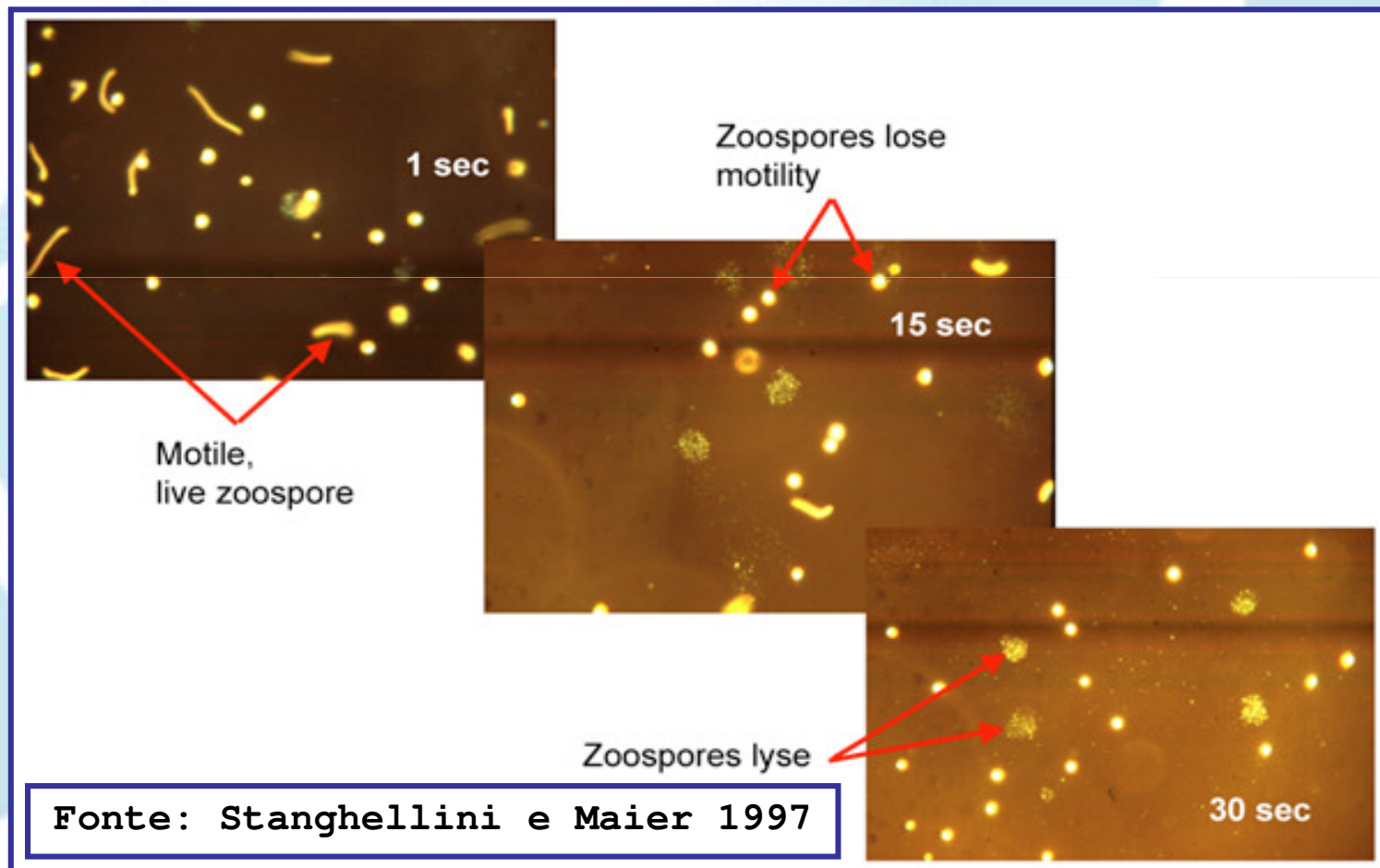
Surfactina:

- inibição de formação de coágulos;
- atividade antibacteriana;
- antifúngica;
- antiviral.

Aplicações (Abalos et al., 2001)

➤ Aplicações Terapêuticas

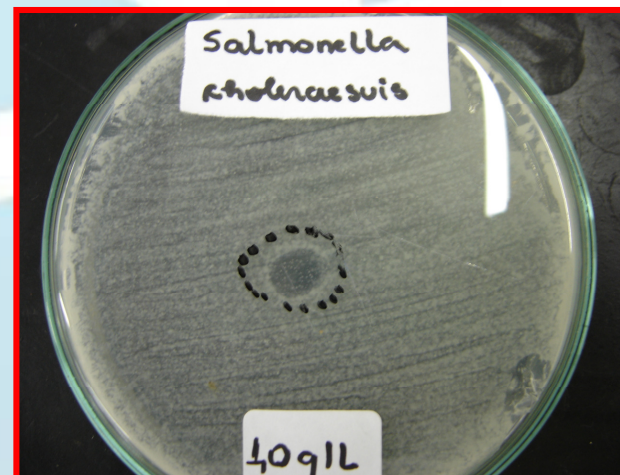
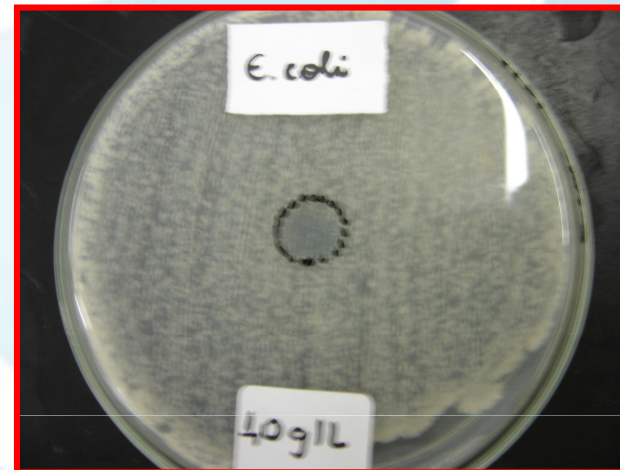
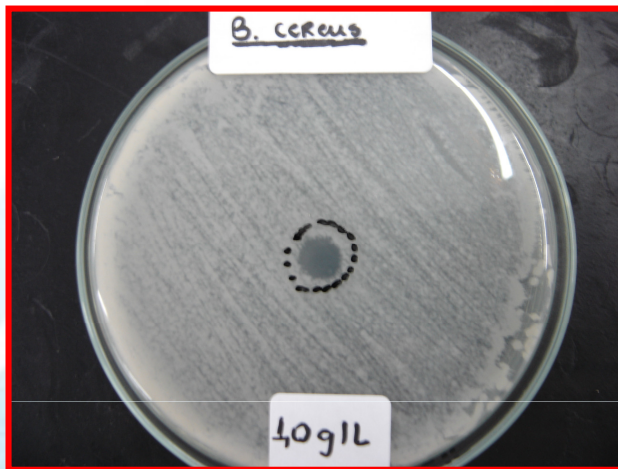
Ramnolipídios: ação zoosporicida



Aplicações (Abalos et al., 2001)

➤ Aplicações Terapêuticas

Atividade antimicrobiana de ramnolipídios



Aplicações (Fiechter, 1992)



➤ Agricultura

- Utilizados em formulações de herbicidas e pesticidas;
- Ramnolipídios são potenciais agentes para controle biológico de fitopatógenos

➤ Produtos de higiene e cosméticos

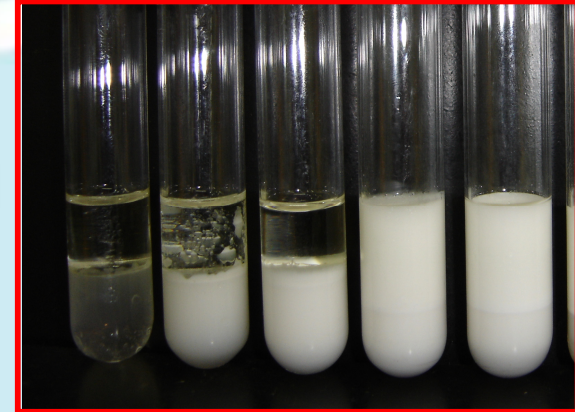
- Utilizado em hidratantes e umectantes (produtos de maquiagem);
- Incorporados em produtos de limpeza.



Aplicações (Fiechter, 1992)

➤ Indústrias de Alimentos

- Agentes emulsificantes no processamento de matéria-prima;



- Auxilia na formação de consistência e textura e na solubilização de aromas;

➤ Outras aplicações

- Indústria de papel, têxtil, tinta (favorece a espalhabilidade e propriedades de mistura), cerâmica.

Aplicações (Mulligan, 2005)

➤ Indústria petrolífera

Recuperação Terciária
do Petróleo (MEOR);

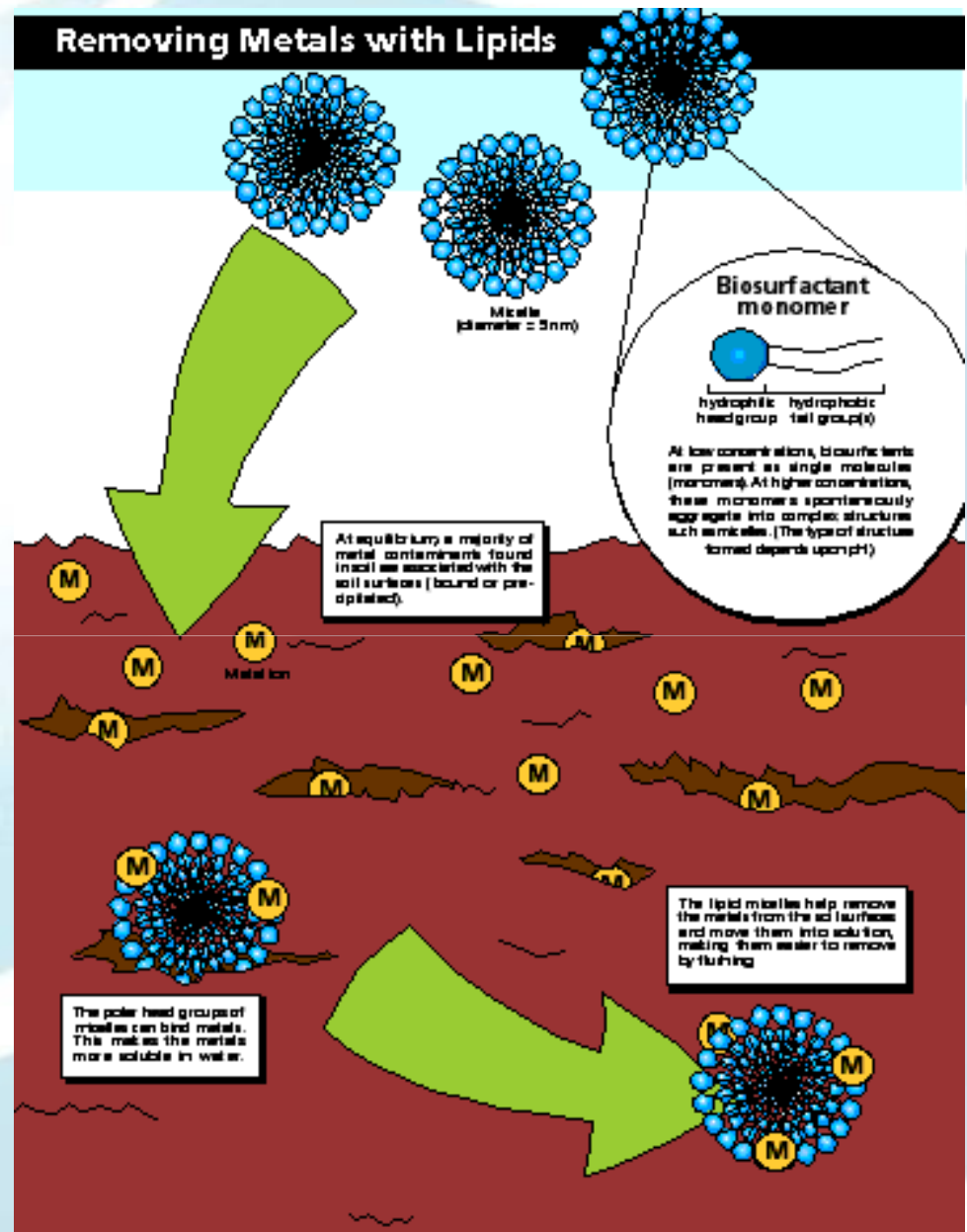
Óleos lubrificantes;

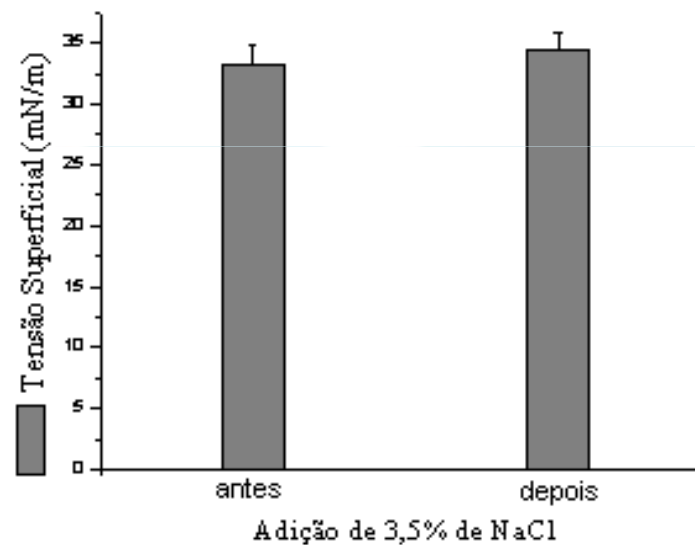
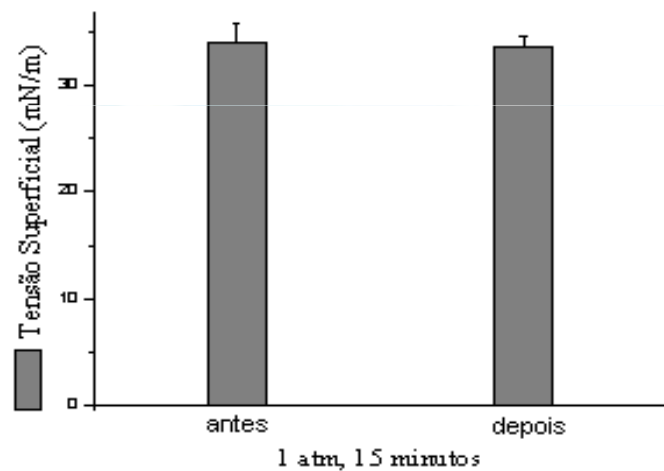
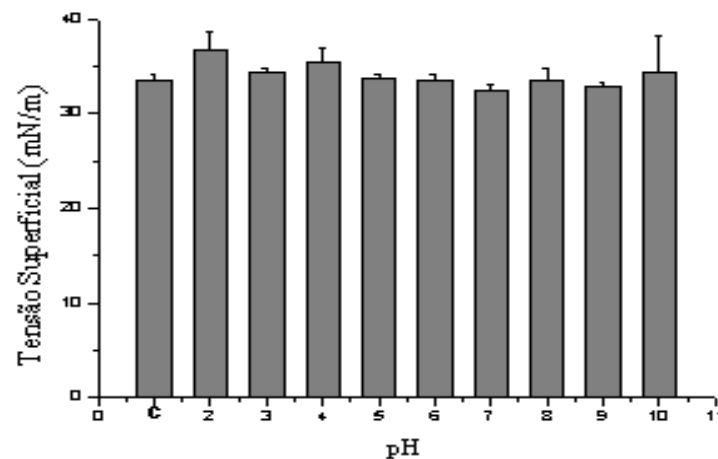
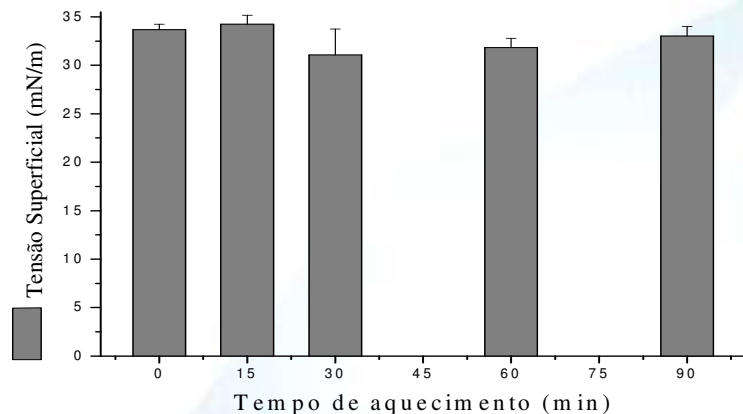
Remoção de resíduos de óleo
em tanques de estocagem;

Processos de
biorremediação e
dispersão nos
derramamentos de óleo



Remoção de metais





tensão superficial do caldo livre de células contendo biossurfactante produzido no cultivo da linhagem *P. aeruginosa* LBI em 2% (w/v) da mistura de óleos usado em fritura de alimentos, submetido à variação de Temperatura, pH, pressão e salinidade.

Nitschke et al. (2005): *P. aeruginosa* LBI em 2% (w/v) de borra de óleo de soja, algodão, milho, palma e babaçu, observaram a predominância do mono-ramnolipídio RhaC10C10 (m/z 503) sobre o di-ramnolipídio Rha2C10C10 (m/z 649)

Costa et al. (2006): *P. aeruginosa* LBI em 2% (w/v) de óleo de babaçu ou de óleo de cupuaçu, também observaram a predominância do mono-ramnolipídio RhaC10C10 (m/z 503).

***P. aeruginosa* LBI:** cultivada em fontes de carbonos **hidrofóbicas**, houve a predominância de RhaC10C10 (m/z 503), enquanto que, quando cultivada em fontes de carbono **hidrofílicas** como glicerol e glicose, houve a predominância de Rha2C10C10 (m/z 649).

***P. aeruginosa* LBI:** em 2% (w/v) de *n*-parafina, uma fonte de carbono hidrofóbica, revelou pequena predominância de Rha2C10C10 (m/z 649) sobre RhaC10C10 (m/z 503). Além disso, também foi detectada a presença dos íons minoritários: Rha2C10C12:1 (m/z 677), Rha2C10C12:2 (m/z 675), Rha2C10C8 (m/z 621), RhaC10C12:1 (m/z 529), RhaC10C12:2 (m/z 527), e, Rha2C10 (m/z 479).

Summary of the experimental results obtained in the investigation of hydrocarbon utilization by *P. aeruginosa* LBI:

Carbon Source (%)	Surface Tension mN/m	Biomass (g/L)	final pH	Rhamnolipid (g/L)
Kerosene (20)	32	2.43	6.8	1.02
Diesel oil (30)	33	5.4	8.4	9.9
Crude oil (10)	36	2.0	7.0	1.4
Oil sludge (10)	36.3	4.0	6.9	1.08

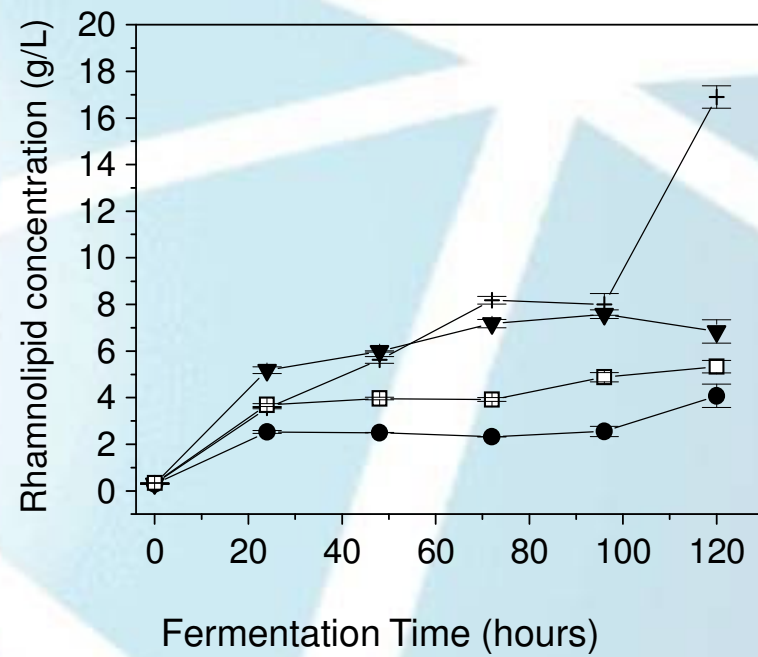
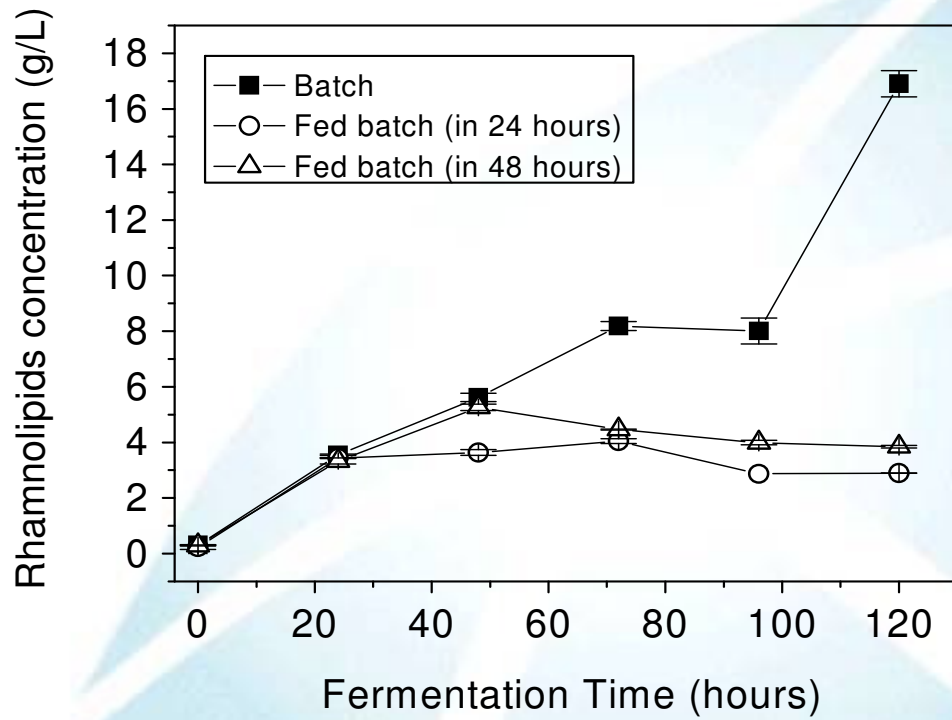
Rhamnolipid emulsifying activity (E₂₄) in cell-free broth of *P. aeruginosa* LBI

Hydrocarbons evaluated (mL)	Emulsifying activity E ₂₄ (%)
Benzene	100
Kerosene	66.7
Diesel oil	70.6
Crude oil	68.7

Properties of the rhamnolipids produced by *P. aeruginosa* LBI

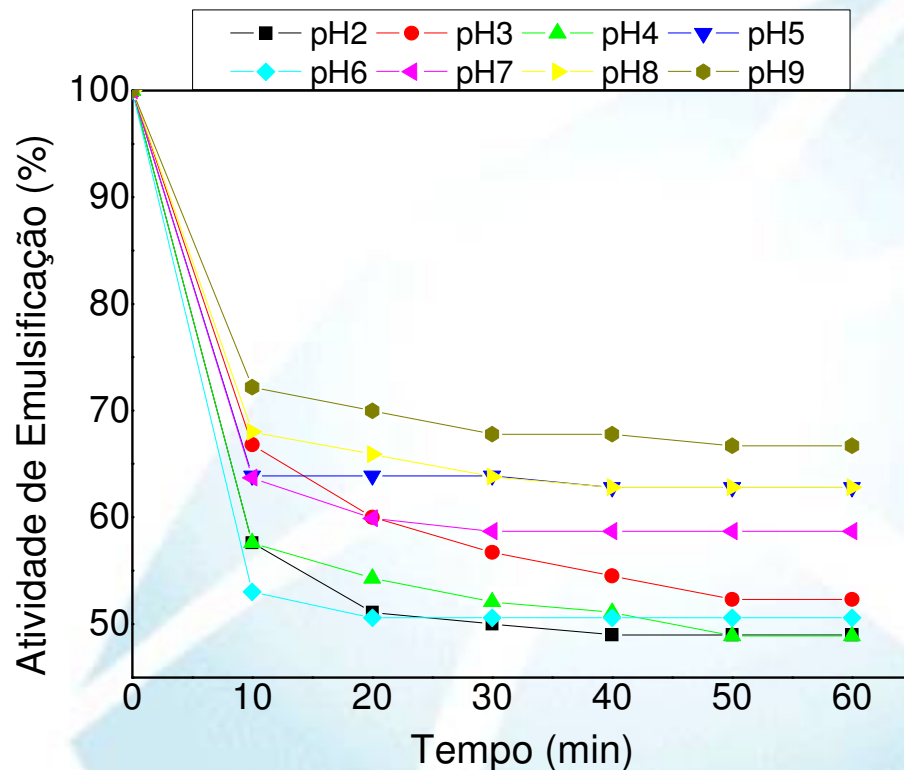
Property (Mean and standard deviation)	Rhamnolipids of <i>P. aeruginosa</i> LBI
Surface Tension (mN/m)	24.9 (SD 0.06)
Interfacial Tension (mN/m)	0.63 (SD 0.06)
Critical micelle concentration (CMC) mg/L	73.9 (SD 0.46)

Lovaglio *et al*, 2008

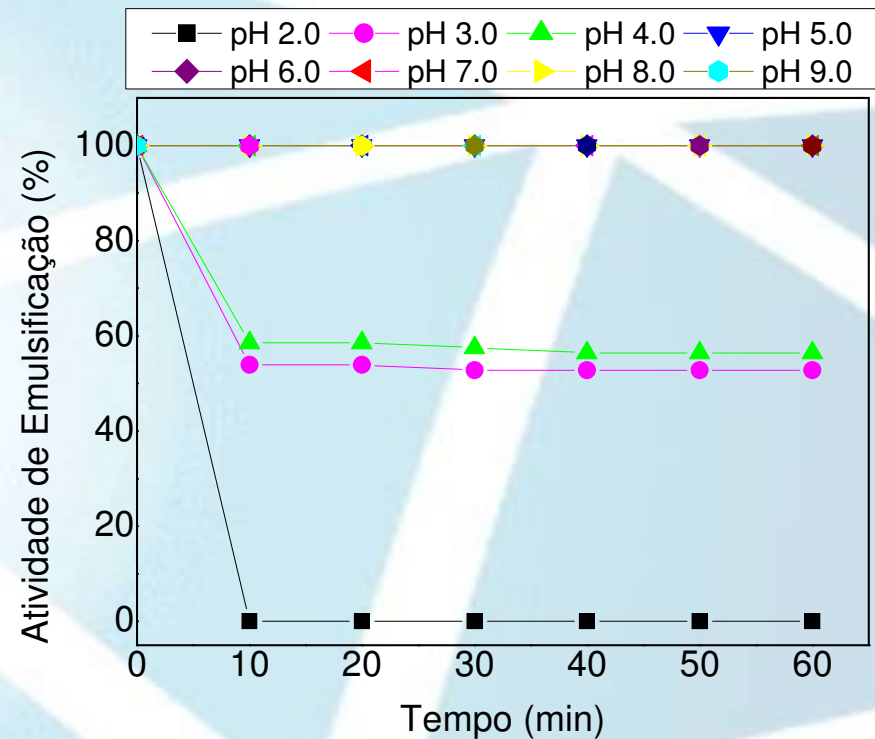


● 1.0 vvm, 500 rpm; ▼ 1.0 vvm, 800 rpm; □ 2.0 vvm, 500 rpm; + 2.0 vvm, 800 rpm

Lovaglio *et al*, 2008



Atividade de emulsificação de soluções 0,1% de ramnolipídios em diferentes valores de pH (2.0 à 9.0) utilizando como fonte hidrofóbica óleo de soja.



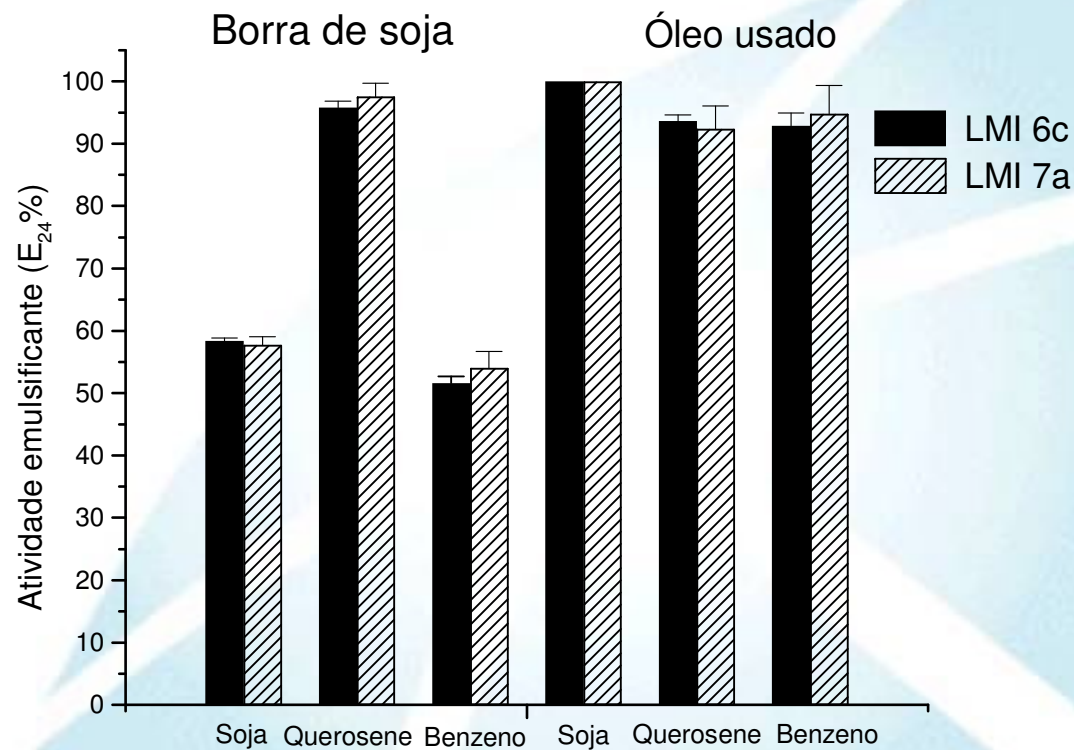
Estabilidade da emulsão formada pela solução 0,1% de ramnolipídios em diferentes valores de pH (2.0 à 9.0) utilizando como fonte hidrofóbica o benzeno.

Tabela 1. Parâmetros da produção de ramnolipídios pelos isolados LMI 6c, LMI 7a e por *P. aeruginosa* LBI após 120 horas de cultivo nos diferentes resíduos oleosos testados.

Microrganismos	Substratos				Parâmetros
	Óleo soja usado	Borra de soja	Gordura de frango	Gordura vegetal	
LBI	1,69	1,67	1,67	1,85	Proteína (g/l)
	5,09	7,52	3,9	1,71	RL ¹ (g/l)
	32,6	33,2	32,3	35	TS ² (mN/m)
	7,23	7,72	8,46	8,64	pH
LMI 6c	1,62	1,57	0,73	1,44	Proteína (g/l)
	6,1	9,69	3,04	2,03	RL (g/l)
	31	31,9	34	35	TS (mN/m)
	5,7	7,01	8,43	8,25	pH
LMI 7a	2,1	1,86	2,74	2,07	Proteína (g/l)
	7,73	7,49	4,88	1,87	RL (g/l)
	34	31,9	34,1	35	TS (mN/m)
	8,22	7,03	8,31	8,5	pH

¹RL : ramnolipídeos

²TS: tensão superficial



Atividade emulsificante dos biotensoativos produzidos pelos isolados LMI 6c e LMI 7a em borra de soja e óleo usado a frente a óleo de soja, querosene e benzeno.

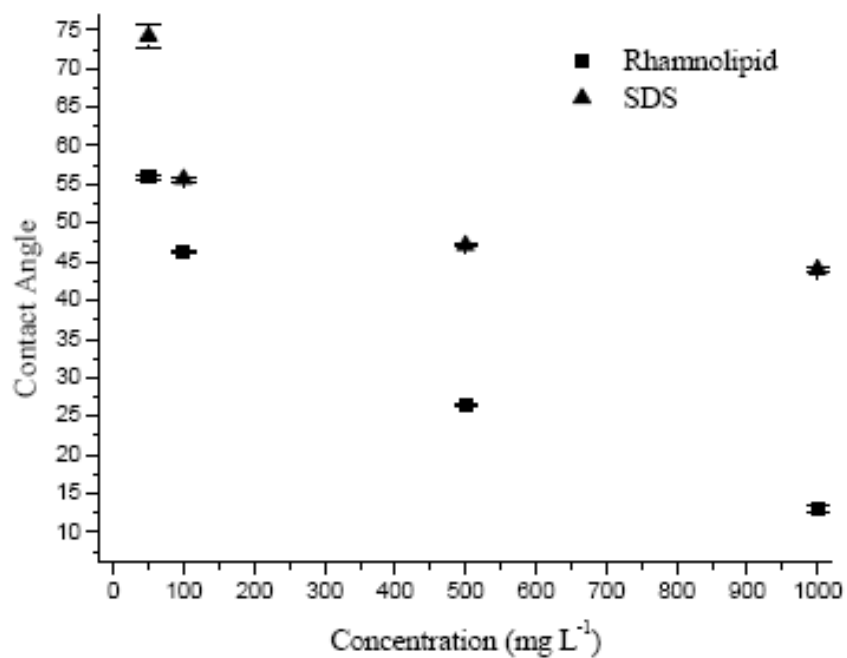
Ciênc. Tecnol. Aliment., 2008

Wettability of aqueous rhamnolipids solutions produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Costa et al, 2008 Journal of surfactants and detergents

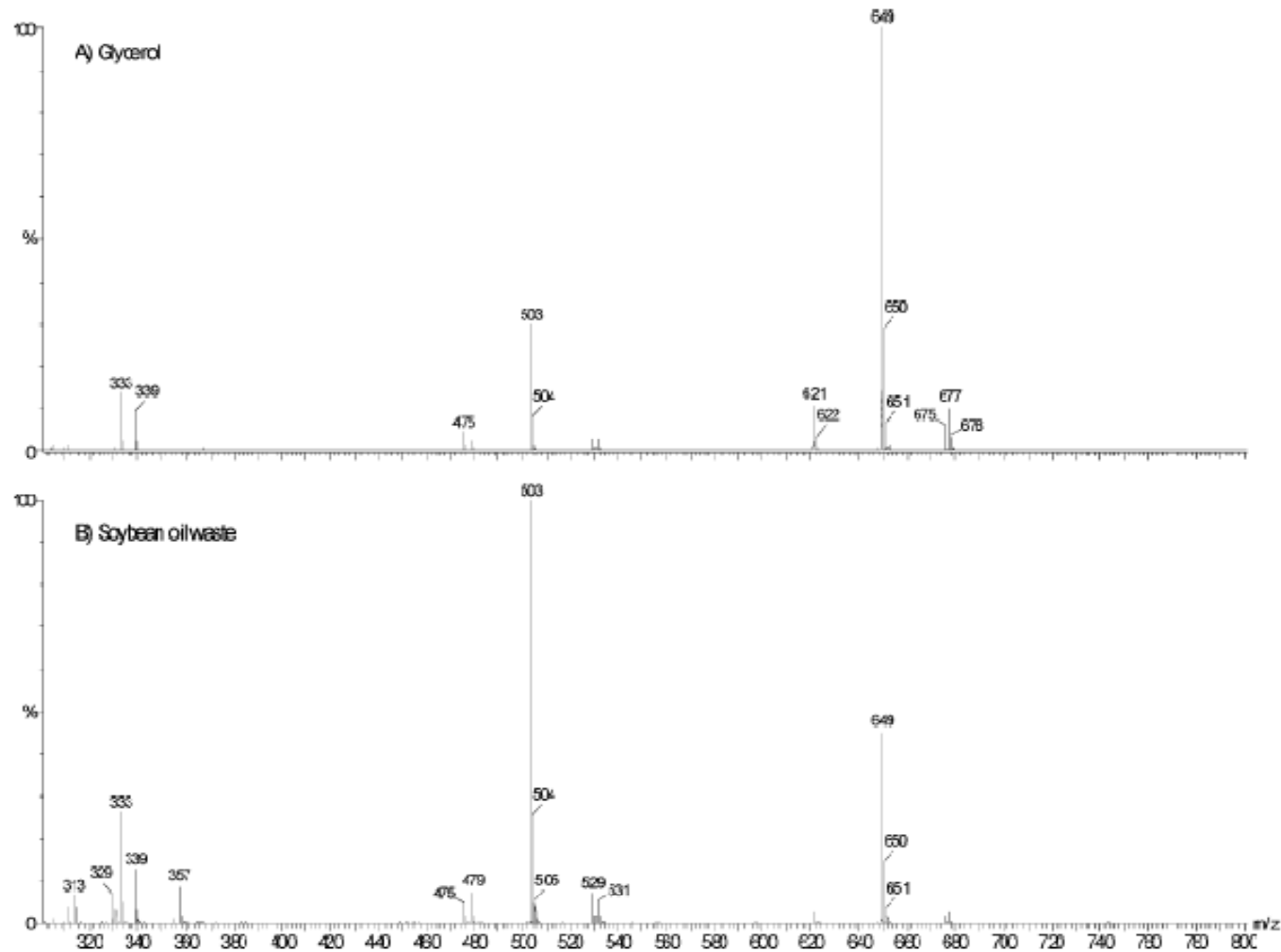
Table1- Contact angles (θ) of pure water on the PCL, PVC, PCL-PVC, PET and glass surfaces.

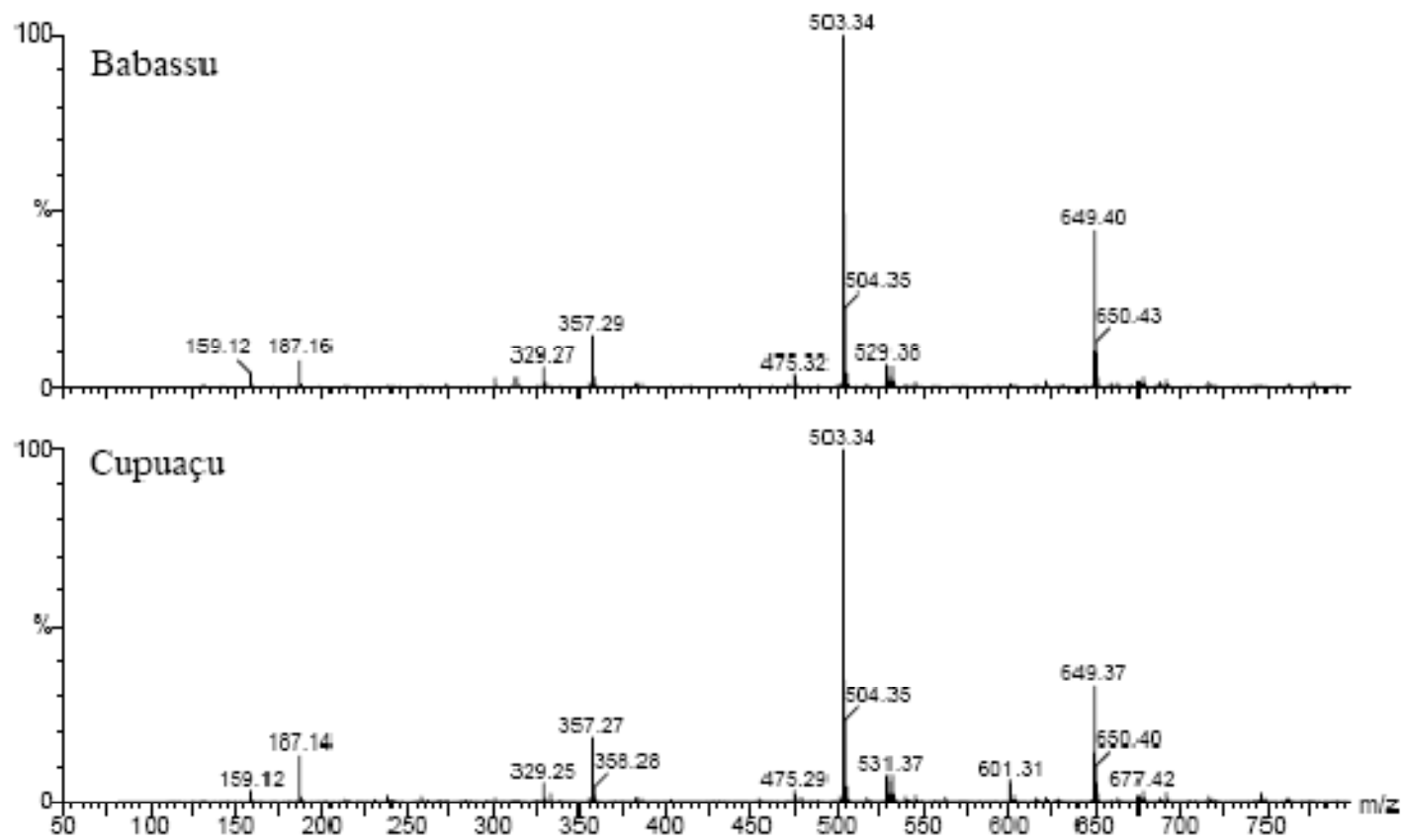
Contact angles (θ)						
Solution	Water	PCL	PVC	PVC-PCL	PET	Glass
S.T. (mN m^{-1})	72.2	76.2 ± 0.7	87.2 ± 0.8	68.6 ± 0.5	74.2 ± 1.1	7.5 ± 1.7

Medida de
ângulo de
contato
para
blenda de
PVC-PCL



Biosurfactant Production by *P. aeruginosa* LBI Growing on Different Carbon Sources and Predominant Rhamnolipid as Determined by ESI(-)-MS Analysis





PERSPECTIVAS

Muitas Aplicações Industriais

Especificidade

Baixa toxicidade

Biodegradabilidade

Ação em condições extremas

Biossurfactante

Altos Custos

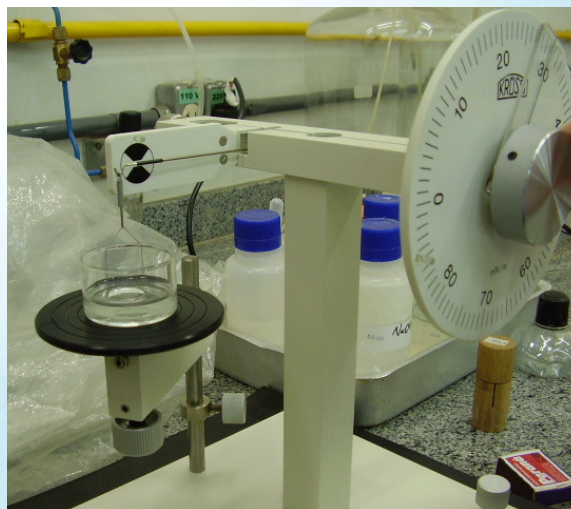
METAS

- Utilização de substratos mais baratos
- Métodos eficientes de purificação
 - Engenharia genética



Metodologia

Tensão superficial (Tensiômetro K6)

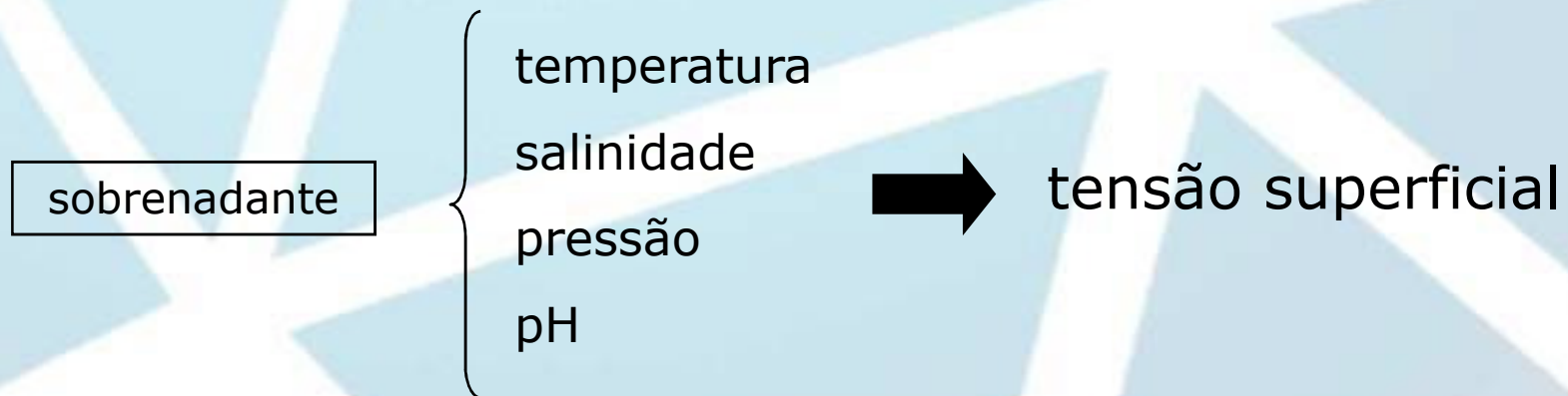


Metodologia

Índice de emulsificação



Estabilidade do biossurfactante



Recuperação dos Ramnolipídios

Para obtenção do ramnolipídio utilizou-se o método de recuperação por coluna de adsorção (ABALOS *et al.*, 2001), o caldo de cultivo foi centrifugado a 12.000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi acidificado a pH 2,0 com H₂SO₄ concentrado e mantido sob refrigeração durante 12 horas. Em seguida este caldo foi centrifugado a 10.000 rpm e o precipitado foi ressuspensão em água destilada e eluído em coluna de adsorção contendo resina de poliestireno Amberlite XAD-2 (Supelco), como descrito por Reiling *et al.* (1986).

Tensão Interfacial

Mediu-se a tensão interfacial entre solução 0,1% (p/v) de ramnolipídios e hexadecano, utilizando-se o tensiômetro Krüss K6

Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) foi determinada medindo-se a tensão superficial de soluções de ramnolipídios em diferentes concentrações, variando de 0,0001 mg/L a 1000mg/L. A leitura da tensão superficial de cada solução foi feita através de um tensiômetro Krüss K6.

Equipe

Prof. Dr. Jonas Contiero – Supervisor do LMI

Siddhartha Georges V. A O Costa – Doutorado Direto – Fapesp

Roberta Barros Lovaglio - Doutorado – Fapesp

Tulio de Luca Cappeline – Bolsista PIBIC/CNPq

Joyce Domingos Ferrari – Aluna da Engenharia Ambiental

Colaboração: Profa. Dra. Lireny A G. Gonçalves – Departamento de Tecnologia de Alimentos – Unicamp

Profa. Dra. Marcia Nitschke – Instituto de Química de São Carlos - Usp

Prof. Dr. Marcos N. Eberlin e Renato Haddad – Laboratório Thomson de Espectrometria de Massa – I.Q./Unicamp

Dr. François Lepine – Institute Armand Frappier- Laval/Quebec

Dr. Rudolf Hausmann – Universidade de Karlsruhe/Alemanha