

Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo

Biosurfactant production by Pseudomonas fluorescens in pineapple broth (Ananas comosus) with burned sunflower oil and application in removal of petrol derivative

Roberto Albuquerque Lima

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Unicap
Recife – PE [Brasil]
roberto_biologia@hotmail.com

Rosileide Fontenele da Silva Andrade

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Unicap
Recife – PE [Brasil]
rosileide_fontenele@yahoo.com.br

Luiz Queiroz Santos

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Unicap
Recife – PE [Brasil]
lqdsantos@hotmail.com

Galba Maria Campos Takaki

Professor, doutor em Microbiologia – Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco – Unicap
takaki@unicap.br

Neste trabalho são apresentados resultados referentes à produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em meio contendo caldo de abacaxi, suplementado com óleo de girassol pós-fritura (5 e 10%) por 72 horas, a 150 rpm e 37°C. Ao final da fermentação observou-se que o biossurfactante produzido em ambas as concentrações de óleo de girassol (5 e 10%) foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72,0 mN/m para 27,5 mN/m. Os índices de emulsificação dos biossurfactantes produzidos corresponderam a 61,54 e 50,00%, respectivamente, para 5 e 10% de suplementação com óleo de girassol (*in natura*), contudo, valores inferiores foram observados com n-hexadecano. Os resultados mais promissores foram observados para o biopolímero obtido com a suplementação de 5%, observando-se uma remoção de 75,4% do óleo queimado proveniente de processo de queima em motor contaminando o solo do semiárido de Pernambuco sugerindo alta eficiência e possível emprego nos processos de biorremediação.

Palavras-chave: Biossurfactante. Caldo de abacaxi. Óleo de girassol. *Pseudomonas fluorescens*.

In this study, biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* in media containing pineapple juice, supplemented with burned sunflower oil (5:10%) for 72 hours at 150 rpm and 37° C are reported. At the end of fermentation, it was observed that the biosurfactant produced in both concentrations of sunflower oil (5 and 10%) were able to reduce the surface tension of water from 72.0 mN/m to 27.5 mN/m. The emulsification index of the biosurfactant produced corresponded to 61.54 and 50.00%, respectively, for 5 and 10% using sunflower oil (*in natura*), but lower values with n-hexadecane were observed. The most promising results were observed for biopolymer obtained with supplementation of 5%, noting a 75.4% removal of burned oil of burning process from motor contaminating the soil from the semiarid region of Pernambuco suggesting higher efficiency and possible use in bioremediation processes.

Key words: Biosurfactant. Pineapple broth. *Pseudomonas fluorescens*. Sunflower oil.

1 Introdução

O gênero *Pseudomonas* pertence à ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaceae, sendo um gênero bastante importante do ponto de vista clínico e ambiental (ANZAI et al., 2000). É uma bactéria em forma de bastonetes Gram-negativo isolados ou em cadeias curtas, móveis possuindo um ou vários flagelos polares monotríquios, são aeróbios facultativos e em alguns casos crescem anaerobicamente, quando usam o nitrato como aceptor de elétrons (HOLT, et al., 1994).

A *Pseudomonas fluorescens* está envolvida na conservação do ambiente, onde a degradação de compostos xenobióticos depende do metabolismo do carbono. A diversidade metabólica dá a esta bactéria uma grande habilidade de adaptação a vários ambientes, tais como solo e rizosfera (LATOURE, LEMANCEUA, 1997).

A poluição causada por hidrocarbonetos constitui séria preocupação ambiental e de saúde, merecendo maior investimento em tecnologias compatíveis para sua remediação. Os maiores problemas são os danos ambientais causados por derrames acidentais e descarga de petróleo ou de resíduos oleosos intencionalmente descartados (LAI et al., 2009).

Atualmente, as soluções mais frequentemente utilizadas para resolver problemas de derramamento de óleo compreendem a utilização de substâncias químicas dispersantes, coagulantes ou uso de redes de contenção de óleo. Contudo, essas práticas além de não serem muito eficientes, são de alto custo. Uma alternativa atraente é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos, ou de seus produtos, capazes de degradar o petróleo e seus derivados. Geralmente, os microrganismos atacam os poluentes com o auxílio de biossurfactantes, por eles produzidos (ROCHA et al., 2006).

Os biossurfactantes são biomoléculas produzidas por microrganismos como bactérias e fungos com diversas aplicações industriais, particularmen-

te, atuando como umectantes, surfactantes, cosméticos, em preparações terapêuticas, no controle da poluição ambiental e na redução da tensão superficial (MULLIGAN, 2004). Estes compostos possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural por meio de engenharia genética ou técnicas bioquímicas e apresentam estabilidade química e térmica (valores extremos de pH e temperatura). Outra vantagem sobre a utilização dos biossurfactantes reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo (SARUBBO et al., 2006; RUFINO et al., 2007).

Dentre os biossurfactantes, destacam-se os raminolipídeos, formados por uma ou duas moléculas de raminose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (DESAI, BANAT, 1997). Os raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp. possuem a capacidade de reduzir a tensão interfacial contra n-hexadecano para 1 mN/m e a tensão superficial da água para 25 a 30 mN/m, usando concentrações entre 10 e 200 mg.L⁻¹ (LANG, WAGNER, 1993). Além de reduzirem a tensão superficial, estabilizam emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (BANAT et al., 2000).

A ampla aplicação de biossurfactantes em biorremediação é limitada pelo seu alto custo de produção. Do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes químicos em função, principalmente, de seu alto custo de produção, associado a processos ineficientes de recuperação e purificação (FOX, BALA, 2000; ROCHA et al., 2006). Contudo, o uso de substratos alternativos como resíduos agroindustriais, pode contribuir favoravelmente para a redução de custos, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50 % do valor do produto final (MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Todavia, o principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos está rela-

cionado à seleção de substrato, de modo que contenha um balanço correto de nutrientes, permitindo o desenvolvimento celular, como também, a produção de insumo de grande interesse (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Entre os substratos, os óleos vegetais extraídos de sementes de várias plantas por meio de processamentos industriais são refinados sem perder a cor, sabor, e odor originais (JORGE et al., 2005). Assim, a crescente utilização de óleos comestíveis para preparação de produtos fritos tem levado a um controle mais rigoroso dos óleos de fritura, uma vez que óleos e gorduras aquecidos e altamente oxidados podem apresentar substâncias potencialmente tóxicas. Entre os principais riscos à saúde envolvidos no consumo dessas substâncias pode-se citar a predisposição à arteriosclerose e a ação mutagênica ou carcinogênica (SANIBAL; FILHO, 2002).

Durante o processo de fritura, óleos e gorduras estão expostos à ação da umidade proveniente do alimento responsável pela alteração hidrolítica; o oxigênio do ar entra na massa de óleo por meio da superfície do recipiente possibilitando a alteração oxidativa e a elevada temperatura em que ocorre a operação, por volta de 180 °C, que provoca alteração térmica. Estes fatores contribuem para reduzir a qualidade do óleo e modificar sua estrutura, principalmente a composição em ácidos graxos, o que permite observar diferenças entre o grau de insaturação, indicando que o óleo de girassol contém maior concentração de ácidos graxos insaturados (89%).

A partir da composição de ácidos graxos, observaram-se diferenças entre o grau de insaturação dos óleos, indicando que o óleo de girassol contém maior concentração de ácidos graxos insaturados, apresentando 89% (JORGE et al., 2005) (Tabela 1).

O problema econômico da produção de biosurfactante pode ser significativamente reduzido por meio do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo. Assim, o ananás (abacaxi), nome utilizado tanto

Tabela 1: Características físicas e químicas orgânicas do óleo de girassol

Parâmetros físicos e químicos	Óleo de girassol
Ácidos graxos livres (% em conteúdo de ácido oléico)	0,13
Índice de peróxidos (mcq/kg)	0,99
Índice de refração (40°C)	1,4679
Compostos polares totais (%)	3,10
Composição em ácidos graxos (conteúdo em %)	
Ácido Palmítico (C16:0)	6,66
Ácido Esteárico (C18:0)	4,32
Ácido Oléico (C18:n9)	21,09
Ácido Linoléico (C18:2n6)	67,78
Ácido Linolênico (C18:3n3)	0,15

Fonte: JORGE et al., 2005.

para a fruta como para a planta, pertence à família Bromeliaceae e gênero *Ananas* Mill. Esse gênero está vastamente distribuído nas regiões tropicais por intermédio da espécie *Ananas comosus*. O fruto é normalmente cilíndrico ou ligeiramente cônico, constituído por 100 a 200 pequenas bagas ou frutinhos fundidos entre si sobre o eixo central ou coração (GIACOMELLI; PY, 1981).

O abacaxi serve como matéria-prima para uma série de produtos, como geléias e compotas. Entretanto, nenhum desses recebe tanto destaque como o suco, alvo de grande número de trabalhos publicados, inclusive na literatura internacional. O fruto do abacaxizeiro destaca-se pelo alto valor energético, em razão de sua alta composição em açúcares, pela presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (C, A, B1, B2 e Niacina); contudo, o teor protéico e de gordura são inferiores a 0,5% (FRANCO, 1989).

No entanto, o fruto apresenta alto conteúdo em bromelina, a qual auxilia o processo de digestão. Trata-se da mistura de enzimas proteolíticas que em meio ácido, alcalino ou neutro, transforma as matérias albuminóides em proteoses ou peptona. A bromelina é encontrada no suco da fruta ou no talo da planta, ocorrendo em maior concentração no cilindro central do abacaxi (MEDINA, 1987). A bromelina tem diversos usos, todos baseados em sua

atividade proteolítica, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Pode-se mencionar sua utilização no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, no pré-tratamento de soja, no tratamento do couro, na indústria têxtil, no tratamento da lã e da seda, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágeno hidrolisado etc. Esta enzima pode ser extraída de todas as partes do abacaxi, talos, coroa, polpa e folhas (CÉSAR, 2005) (Tabela 2).

Tabela 2: Aminoácidos presentes na bromelina

Aminoácidos	Polpa (mg/100g de amostra)
Asparagina	2,588
Glutamina	2,410
Serina	1,025
Glicina	869
Treonina	836
Alanina	1085
Arginina	905
Tirosina	938
Cisteína	727
Valina	909
Triptofano	604
Fenilalanina	720
Isoleucina	772
Leucina	1,068
Lisina	1,515
Prolina	1,456

Fonte: FREIMAN; SRUR, 1999.

As frutas e seus produtos são em geral alimentos ácidos, ou que podem ser acidificados para melhor conservação. A maior parte da microbiota contaminante reside na parte externa das frutas. O interior é praticamente estéril se não houver ruptura de continuidade por lesões na casca (ROSA; CARVALHO, 2000).

O objetivo do trabalho foi investigar a produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em meio natural de baixo custo a partir da utilização do caldo de abacaxi e óleo de girassol pós-fritura como substrato, como também avaliar a eficiência do biopolímero na remoção do óleo queimado de motor em solo do semiárido de Pernambuco.

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

Microrganismo: A linhagem de *Pseudomonas fluorescens* UCP (1514) foi obtida do banco de cultura Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, a qual é cadastrada no World Federation Culture Collection-WFCC. A linhagem foi mantida em ágar nutritivo [(p/v) peptonona 5g, extrato de carne 3g, cloreto de sódio 1g, ágar 15g, água destilada 1000 mL], temperatura de 5°C, sendo repicada a cada 3 meses, para obtenção de cultura jovem.

Matéria-prima: O abacaxi (*Ananas comosus*) utilizado para o meio natural na produção de biossurfactante foi adquirido comercialmente. Primeiramente, retirou-se do abacaxi a coroa e a casca, em seguida foi obtido por liquidificação do pseudofruto [100 g/L água destilada] o caldo, em processador de alimentos. Subsequentemente, o caldo foi filtrado em papel de filtro com poros de 25 µm e diluído na proporção de 1:10 e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Substratos: O substrato utilizado foi o óleo de girassol comercial, oriundo do descarte de estabelecimento comercial, utilizado em 10 processos de fritura.

2.2 Métodos

Preparação do pré-inóculo: A *Pseudomonas fluorescens* foi repicada em placas de Petri contendo o meio Ágar Nutritivo incubada a temperatura de 37°C por 24 horas a fim de se obter uma cultura jovem. Células de *Pseudomonas fluorescens* UCP (1514) foram transferidas para Erlenmeyer com 250 mL de capacidade contendo 50 mL de Caldo Nutritivo, mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, a temperatura de 37 °C por um período de 24 horas correspondendo, ao final, a 10⁻⁸ UFC/mL.

Produção de Biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens*: A produção de biossurfactante por *P. fluorescens* foi realizada em frascos de Erlenmeyer com 500 mL de capacidade contendo 150 mL do meio natural (suco de abacaxi), com ajustado para pH 6,0 com uma solução 1N de NaOH, posteriormente adicionado de 7,5 mL e 10,0 mL de óleo de girassol pós-fritura, correspondendo a 5% e 10%, respectivamente. Os frascos foram esterilizados em autoclave, em vapor fluente por 15 minutos, resfriados e adicionados de 7,5 mL do pré-inóculo (5%), crescidos em caldo nutriente na concentração de 10^7 UFC/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, por 72 horas, à temperatura de 37 °C. Após esse período, o líquido metabólico livre células foi obtido por centrifugação a 10.000 g, por 20 minutos, seguido de filtração em membrana Millipore de 0.22 μ m. Em seguida, o líquido metabólico foi submetido à determinação do pH, índice de emulsificação, tensão superficial e o crescimento foi avaliado pela técnica de *pour plate*.

Crescimento celular: O crescimento celular foi avaliado pela técnica de *pour plate*, a partir de alíquotas de 0,1 mL, diluídas a 10^{-3} e 10^{-5} , incorporadas ao meio Agar Nutriente. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C, durante 48 horas para realização da contagem das colônias viáveis. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

2.3 Métodos Analíticos

Determinação do índice emulsificação: A determinação do índice de emulsificação foi realizada utilizando o líquido metabólico livre de células após 72 horas de fermentação, segundo o método de Cooper e Goldenberg (1987). Cerca de 2,0 mL do líquido metabólico livre de células a 1,0 mL de óleo de girassol *in natura* e do n-hexadecano em tubos graduados. A mistura foi agitada em vórtex por dois minutos na velocidade máxima. Os

tubos foram deixados em repouso por 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado através da equação: índice da emulsão (%) $E_{24} = He \times 100 / Ht$, onde He = altura da emulsão; Ht = altura total do líquido. O resultado obtido foi expresso em percentual.

Determinação da tensão superficial: A determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante foi medida em tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd., Finland) utilizando-se o anel de DU NUOY por meio de sua imersão no líquido, registrando-se a força requerida para puxá-lo por meio da interface ar-líquido, de acordo com Kuykina et al. (2001), expresso em mN/m em relação à tensão superficial da água.

Determinação do pH do meio de cultivo: O pH do meio de produção fermentado foi determinado utilizando-se um potenciômetro da marca Orion, modelo 310.

Aplicação do biossurfactante em solo do semiárido (PE) na remoção do óleo queimado de motor: Realizou-se o teste de biorremoção utilizando o biossurfactante presente no líquido metabólico livre de células, da melhor condição, em solo coletado do semiárido de Pernambuco (Tabela 3, composição do solo), contaminado com óleo queimado de motor de acordo com a metodologia de Nitschke e Pastore (2002).

Tabela 3: Caracterizações física e química do semiárido de PE

Parâmetros	Resultados
pH	4,45
Ca ²⁺ (cmolc dm ⁻³) ¹	0,95
Mg ²⁺ (cmolc dm ⁻³) ¹	0,25
K ⁺ (cmolc dm ⁻³) ¹	0,02
Al ³⁺ (cmolc dm ⁻³) ¹	0,75
P (cmg dm ⁻³) ²	17,72
SB (cmolc dm ⁻³)	1,22
CTC (cmolc dm ⁻³)	1,97
Areia (g kg ⁻³) ¹	537
Silte (g kg ⁻³) ¹	33,7
Argila(g kg ⁻³) ¹	429,3

Fonte: OLIVEIRA et al., 2007.

3 Resultados e discussão

3.1 Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em meio natural utilizando óleo de girassol pós-fritura como substrato

Os produtos agroindustriais vêm sendo amplamente empregados na produção de biossurfactantes, considerando que é interessante sob o ponto de vista da preservação ambiental e que a maioria dos surfactantes comercializados são derivados do petróleo. Nesse sentido, a busca de biossurfactantes está associada aos rápidos avanços na biotecnologia e às contaminações ambientais, levando a mudanças nas legislações e o interesse na substituição dos surfactantes químicos derivados do petróleo (BANAT et al., 2000).

Portanto, esta investigação foi realizada considerando a grande habilidade biotecnológica de *P. fluorescens* em crescer em diferentes substratos. Assim, foi investigada a produção de biossurfactante em um meio utilizando substrato agroindustrial, caldo de abacaxi suplementado com 5% do óleo de girassol pós-fritura observando-se a produção de um potente tensoativo com significativa redução da tensão superficial da água de 72 mN/m para 27,5 mN/m. Observou-se ainda que o aumento da concentração do óleo de girassol para 10% não causa interferência na redução da tensão, permanecendo o mesmo valor de tensão superficial (27,5mN/m) (Tabela 4).

Tabela 4: Surfactantes, microrganismos produtores e tensão superficial

Biossurfactante	Microrganismo produtor	Tensão Superficial (mN/m)
*Raminolipídeo	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27,5
Serrawettina	<i>Serratia marcescens</i>	27,2
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	25,1
Triton X-100	Sistema químico	32,7
Tween 80	Sistema químico	43,7

Fonte: LAY et al., 2009.

Os resultados obtidos demonstram um excelente crescimento de *P. fluorescens* no meio alternativo a base de caldo de abacaxi, suplementado com 5% de óleo de girassol (pós-fritura), sendo observado desenvolvimento máximo com 16 horas de cultivo, seguido de uma fase estacionária que se prolongou até 72 horas, quando ocorreu a produção de biossurfactante (Figura 1).

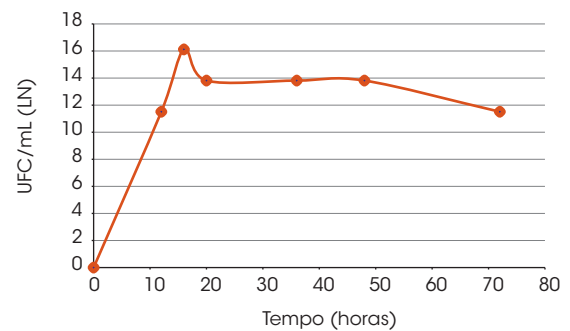


Figura 1: Curva de crescimento de *P. fluorescens* em meio caldo de abacaxi suplementado com 5% do óleo de girassol pós-fritura após 72 horas de cultivos

Fonte: Os autores.

A utilização do petróleo como substrato na produção de biossurfactante por *P. fluorescens* foi demonstrada por Silva et al. (2009), utilizado na concentração de 4%, havendo redução da tensão superficial de 70 mN/m para 30,04 mN/m (Figura 2).

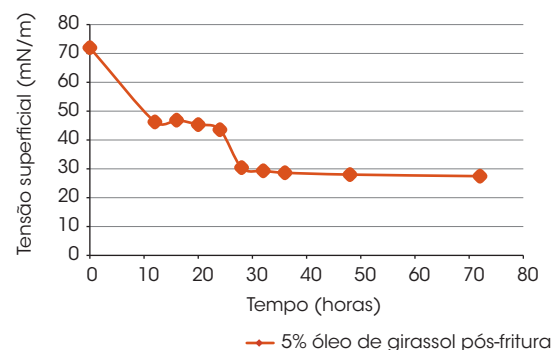


Figura 2: Cinética de produção de biossurfactante demonstrada através da redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células de *P. fluorescens* crescida em 5% do óleo de girassol pós-fritura durante 72 horas

Fonte: Os autores.

Os resultados referentes à produção do biossurfactante, quando comparados com os obtidos por Silva et al. (2009), demonstram maior habilidade de *P. fluorescens* em produzir o biopolímero em meio natural (caldo de abacaxi suplementado com 5% do óleo de girassol pós-fritura) havendo maior redução da tensão superficial. Desta forma, os resultados obtidos contribuem na formulação de um novo meio de baixo custo para produção de biossurfactante.

Os dados obtidos estão de acordo com os da literatura por relatarem a utilização de microrganismos como assimiladores de petróleo e derivados, em processos de biorremediação, causados por derrames acidentais de petróleo ou de resíduos oleosos (LAY et al., 2009).

Neste contexto, *P. fluorescens* apresenta excelente capacidade de reduzir a tensão superficial e produzir biossurfactante em meio de baixo custo composto por substrato hidrofílico (óleo de girassol pós-fritura) utilizado, provavelmente, pelo microrganismo como fonte de carbono.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos na literatura comprovando a habilidade de *P. fluorescens* de utilizar vários substratos hidrofóbicos na produção do biopolímero (SILVA, et al., 2009). Além do consumo do substrato hidrofóbico, *P. fluorescens* foi capaz de utilizar os nutrientes hidrofílicos, como fontes de nitrogênio, presentes no meio de produção, havendo um equilíbrio ideal das fontes de carbono e hidrogênio, em pH neutro, essenciais para produção do metabólito secundário (ABOUSEOUD et al., 2008).

Luna et al. (2008), encontraram resultados similares na produção de agentes surfactantes por *Candida sphaerica* em meio de baixo custo constituído por água do mar, milhocina e resíduos industriais obtendo a máxima redução de 27 mN/m.

Verificou-se ainda, que o biossurfactante produzido apresenta excelente propriedade emulsificante quando utilizado o óleo de girassol *in natura* como substrato hidrofóbico, produzindo

61,54% de emulsificação, contudo quando utilizado o n-hexadecano observou-se apenas 50% de emulsificação.

Os resultados obtidos apresentados na Figura 3 estão de acordo com os relatados pela literatura, em que *P. fluorescens* é indicada como microrganismo com habilidade de degradar hidrocarbonetos derivados do petróleo, como o n-hexadecano, óleos vegetais e óleo cru (ABOUSEOUD et al., 2008).

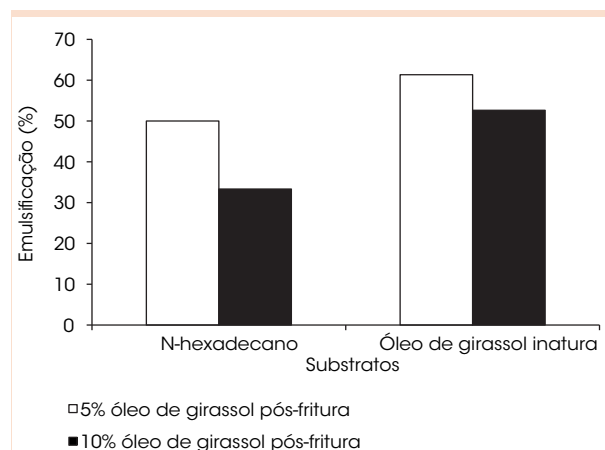


Figura 3: Resultado do índice de emulsificação utilizando n-hexadecano e óleo de girassol *in natura* como substrato em meio de produção contendo 5% e 10% de óleo de pós-fritura

Fonte: Os autores.

Segundo Silva et al. (2009), *P. fluorescens* apresentou capacidade de emulsificar hidrocarbonetos do petróleo durante o processo de degradação do substrato.

3.2 Influência do óleo de girassol no meio de produção

Segundo Jorge et al. (2005), o óleo de girassol apresenta em sua composição 89% de ácidos graxos insaturados. Neste contexto, comprovaram que quanto maior for a porcentagem de ácidos graxos insaturados no óleo maior será a sua alteração durante o processo de fritura.

Para produção de biossurfactante por *P. fluorescens* foram testadas diferentes concentrações

do óleo de girassol pós-fritura (5% e 10%), com o objetivo de investigar os efeitos produzidos pelos componentes do substrato no meio de produção.

Nascimento et al. (2001) comentaram que o óleo já queimado pela fritura produz acroleína na decomposição de glicerol, substância considerada altamente tóxica que pode vir a prejudicar o metabolismo microbiano como um todo. Entretanto, observou-se que o meio contendo o suco de abacaxi com 5% do óleo de girassol pós-fritura foi propício ao desenvolvimento havendo resistência por *P. fluorescens* a algumas substâncias tóxicas, como a acroleína, indicando a possível degradação desta substância pelo microrganismo, necessária para produção do biossurfactante.

3.3 Composição bioquímica do meio de cultivo selecionado

O meio de cultivo selecionado com significativa produção de biossurfactante é composto pelo suco de abacaxi adicionado de 5% do óleo de girassol pós-fritura, apresentando em sua composição glicídios, proteínas, aminoácidos e alguns sais minerais como fósforo, potássio, cálcio e ferro (Tabela 5).

Tabela 5: Composição bioquímica do caldo de abacaxi

Componentes	Quantidade (por 100 gramas)
Proteínas	0,40g
Carboidratos	13,7g
Lipídios	0,20g
Fibras	0,95 mg
Calorias	52 kcal
Minerais	
Cálcio	18,00 mg
Fósforo	8,0 mg
Ferro	0,50 mg
Vitaminas	
Niacina	0,82 mg
Riboflavina	128,00 mcg
Tiamina	80,00 mcg
Ac. Ascórbico	27,20 mcg
Retinol	5,00 mcg

Fonte: FRANCO, 1989.

3.4. Aplicação do biossurfactante produzido por *P. fluorescens* para realização da remoção de óleo queimado de motor contaminando o solo

A biorremediação utilizando o tratamento com líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante removeu 75,4% do óleo motor queimado presente no solo. Ao aumentar a concentração do óleo motor queimado (10%) observou-se que o biossurfactante presente no líquido metabólico livre de células conseguiu remover 67% do óleo motor queimado. Em estudos realizados por Cameotra e Makkar (1998), o biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de remover 56% do óleo adsorvido em areia contida em coluna (Figura 4).

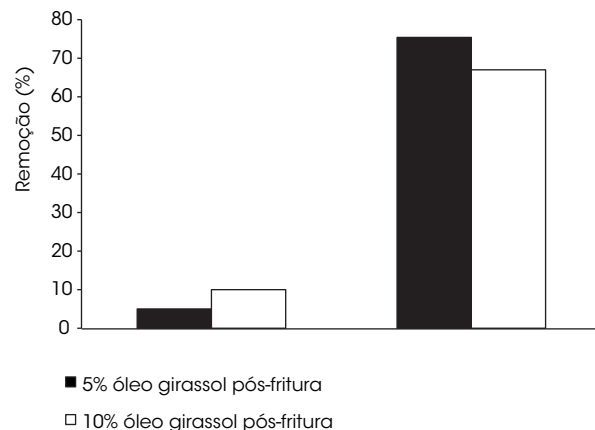


Figura 4: Remoção de óleo queimado de motor pelo biossurfactante produzido por *Pseudomonas fluorescens* nas concentrações de 5% e 10% do óleo de girassol pós-fritura

Fonte: Os autores.

Portanto, os estudos realizados demonstraram a influência de meios naturais, como o caldo de abacaxi suplementado com óleo de girassol pós-fritura, como excelentes fontes de carbono e nitrogênio no meio de produção. Além disso, as fontes principais carbono (óleo pós-fritura) e nitrogênio (caldo de abacaxi), como também outros micronutrientes demonstraram ser parâmetros importantes

na produção de biossurfactante por *P. fluorescens*. E ainda, observou-se que a produção do biossurfactante não foi influenciada pela concentração do substrato empregado. Assim, inúmeras alternativas devem ser objeto de novos estudos, inclusive relacionado suplementação com fontes hidrofílicas de carbono, além de outras fontes hidrofóbicas.

Pesquisas realizadas por Guimarães (2005) demonstraram que as leveduras dependem de fontes de carbono para seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos os nutrientes de maior importância. O carbono pode ser fornecido aos microrganismos na forma de carboidratos, aldeídos, glicerina ou etanol. A fonte de carbono determina o tipo e as propriedades dos biossurfactantes, enquanto a fonte de nitrogênio influencia diretamente no crescimento celular (FONTES et al., 2008). Entretanto, neste trabalho utilizou-se o óleo de girassol pós-fritura, rico em ácidos graxos, na concentração de 5%, que foi suficiente para produzir um potente tensoativo. Portanto, esses resultados são corroborados pela literatura que relata que os hidrocarbonetos do petróleo são altamente hidrofóbicos, propiciando a produção de agentes surfactantes com baixa tensão superficial (SILVA et al., 2009). Além disso, o biossurfactante apresentou grande habilidade de remoção de poluentes hidrofóbicos, sendo estas informações apoiadas pela literatura (SILVA et al., 2009; SILVA et al. 2010).

4 Conclusões

Os resultados obtidos propõem a formulação de um meio alternativo e de baixo custo, tendo como base o caldo de abacaxi, como também o reaproveitamento do óleo de girassol pós-fritura para a produção de biossurfactante. Um agente tensoativo com menor redução da tensão superficial e da habilidade de emulsificação obteve-se com o óleo de girassol pós-fritura (5%), demonstrando o

potencial promissor de *P. fluorescens* na produção do biossurfactante. Além disso, o biossurfactante produzido demonstrou ser eficiente na remoção do óleo queimado de motor contaminando o solo do semiárido, sugerindo sua utilização em processos de biorremediação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da FACEPE, CAPES, CNPq e UNICAP na realização da pesquisa e das bolsas dos mestrandos.

Referências

- ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, A. Nabi Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v.223, p.143-151, 2008.
- ANZAI, Y; KIM, H.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, p.1563-1589, 2000.
- BANAT, I. M.; MAKKAR R. S.; CAMEOTRA S. S. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, p.495-508, 2000.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.50, p.520-529, 1998.
- CÉSAR, A. C. W. *Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi*. 2005, 98p. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2005.
- COOPER, D. G; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Appl Environ Microbiol.*, v. 53, p.224-229, 1987.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 61, p.47-64, 1997.
- FONTES, G.C.F; AMARAL, P.F.F; COELHO, M.A.C. Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*, v. 31, n. 8, 2008.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, v. 75, p.235-240, 2000.

- FRANCO, G. *Tabela de composição química dos alimentos*. 8.ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, p.230, 1989.
- FREIMAM, L. O.; SRUR, A. U. O. S. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*, (L.) Merril). *Ciência e tecnologia de alimentos*, v 19, p.270-273, 1999.
- GIACOMELLI, E. J.; PY, C. *Abacaxi no Brasil*. Campinas: Fundação Cargill, p.101, 1981.
- GUIMARÃES, T. M. Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho. [Mestrado] Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 101 p, 2005
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams e Wilkins, Baltimore (USA), 130p, 1994.
- JORGE, N.; SOARES, B. B. P.; LUNARDI, V. M.; MALACRIDA, C. R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. *Química. Nova*. v. 28, n. 6, p.947-951. 2005.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUMBAR, S. A.; RITCHKOV, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods*, v. 46, p.109-120, 2001.
- LANG, S.; WAGNER, F. Bioconversion of Oil and Sugar to Glycolipids. In: Kosaric, N. *Biosurfactants: production, properties, applications*, New York; Ed. Marcel Dekker. p.205-227, 1993.
- LAI, C. C.; HUANG Y. C.; WEY, Y. H.; CHANG, J. S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, v.167, p. 609-614, 2009.
- LATOUR, X.; LEMANCEAU, P. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie*, v. 17, p. 9-10, 1997.
- LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. *Exacta*, v. 6, n. 2, p. 209-215, 2008.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 2, p.237-241, 1999.
- MEDINA, J. L.; BLEINROTH, E. W.; MARTIN, Z. J.; TOCCHINI, R. P.; SOLER, M. P. *Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos*. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.285, 1987.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v.133, p.183-198, 2004.
- NASCIMENTO, M. G; COSTA, P. N.; MAZZUCCO, L. M. Biotransformação de óleos e gorduras. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.19, Brasília, 2001, p.28-31.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p.772-776, 2002.
- OLIVEIRA, A. C.; FREIRE, F. J.; FERNANDES, M. B. Níveis Críticos de Enxofre em Solos de Pernambuco. *Revista Caatinga* (Mossoró, Brasil), v.20, n.3, p.93-103, 2007.
- ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 22, p. 1295-1299, 2006.
- ROSA, O. O.; CARVALHO, E. P. Características microbiológicas de frutos e hortaliças minimamente processados. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.34, n.2,p.84-92, 2000.
- RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of Stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n 05, p.729-734. 2007.
- SANIBAL, E. A. A.; FILHO, J. M. Alterações Físicas, Químicas e Nutricionais de Óleos Submetidos ao Processo de Fritura. *Foods Ingred*, v. 18, p.64, 2002.
- SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability of the bioemulsifier obtained from a new of *Candida glabrata* UCP 1002. *Eletron. J. Biotechnol.*, v .9, p.400-40, 2006.
- SILVA, T. A. L.; ARAUJO, H. W. C.; TAMBOURGI, E. B; SILVA, A. A. A.; CAMPOS- TAKAKI, G. M. Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato. *Exacta*, v 7, n.1, p.31-37, 2009.
- SILVA, T. A. L.; LUNA, J. M.; MORAIS FILHO, M. A.; TAMBOURGI, E. B; SILVA, A. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. *Exacta*, v 8, n.1, p.19-26, 2010.

Recebido em 14 abr. 2010 / aprovado em 24 jul. 2010

Para referenciar este texto

LIMA, R. A. et al. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.