

INFLUÊNCIA DO MEIO MINERAL NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Gean Pablo Silva Aguiar (FURG) g.pablo@hotmail.com
Vilásia Guimarães Martins (FURG) vilasiamartins@furg.br
Paola Chaves Martins (FURG) pah_chaves@hotmail.com
Raphael Aparecido Boschero (FURG) r.boschero@yahoo.com.br
Carlos Prentice-Hernández (FURG) dqmprent@furg.br

Resumo: Os biossurfactantes são promissores substitutos para surfactantes químicos, que geralmente são derivados do petróleo devido ao fato de que os surfactantes biológicos apresentam as mesmas características dos surfactantes químicos, além de serem biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade. Porém, a produção do biossurfactante apresenta elevados custos de produção em relação à versão química. A produção de biossurfactantes a partir de resíduos de Corvina foi realizado por *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum* na concentração de 2%, utilizando-se 3 diferentes meios minerais, meio 1 (NaCl, Extrato de levedura e peptona); meio 2 (peptona) e meio 3 (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 e EDTA), a fim de determinar qual destes meios forneceria condições apropriadas para produção do biossurfactante. Neste contexto, as condições de cultivo foram: agitação de 200 rpm, 30°C por 72 h. Durante o processo fermentativo foram avaliados a tensão superficial e a atividade emulsificante a cada 24h e, finalmente, o meio mineral 3 obteve o melhor resultado tendo tensão superficial de 28,54 mN/m, sendo promissor, o que pode ser afirmado porque surfactante biológico mais conhecido, a Surfactina, possui tensão próxima de 27 mN/m.

Palavras-chaves: Surfactantes biológicos; *Micropogonias furnieri*; *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum*.

INFLUENCE OF MINERAL MEDIUM IN PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS

Abstract: The biosurfactants are promising substitutes for chemical surfactants, which are generally derived from oil due to the fact that the surfactants have the same biological characteristics of chemical surfactants, in addition to being biodegradable, its low toxicity. However, production of the biosurfactant features high production costs compared to the version Chemistry. Production of biosurfactants from croaker residues was performed by *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium aquaticum* a concentration of 2%, using three different mineral resources, 1 medium (NaCl, yeast extract and peptone); 2 medium (peptone) and 3 medium (NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 e EDTA), in order to determine which of these means provide appropriate conditions for production of biosurfactant. In this context, growing conditions were: 200 rpm shaking, 30° C for 72 h. During the fermentation process were evaluated surface tension and emulsifying activity every 24 hours and, finally, the mineral medium 3 obtained the best results with the surface tension of 28.54 mN/m, and promising, which can be stated as most known organic surfactant, surfactin, has near surface tension of 27 mN/m.

Keywords: Biological surfactants; *Micropogonias furnieri*; *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium aquaticum*.

1. INTRODUÇÃO

A busca por novas tecnologias que visam reduzir os impactos ambientais vem demonstrando que os processos biológicos são a melhor escolha. Neste contexto, surge a produção de surfactantes de origem biológica que se trata de moléculas tensoativas capazes de diminuir a tensão superficial e que possuem inúmeras aplicações industriais.

Os surfactantes biológicos são compostos anfipáticos capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos (BICCA et al., 1999), a grande maioria dos biossurfactantes relatados na literatura é de origem bacteriana (INOH et al., 2001), sendo que sua produção depende do substrato utilizado para produção, da cinética do crescimento e da linhagem (KARANTH et al., 1999). As bactérias produtoras mais reportadas são dos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp. (GOUVEIA et al., 2003).

A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Porém, com aumento da preocupação ambiental entre os consumidores associado com novas legislações de controle do meio ambiente, isso incentivou a procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes (Nitschke & Pastore, 2002).

O sucesso da produção de surfactantes biológicos depende do desenvolvimento de processos com o uso de matérias-primas de baixo custo, devido ao fato de que as mesmas são responsáveis por cerca de 30% de todo o valor de produção. Apesar disso, poucos trabalhos têm sido publicados visando à produção de biossurfactantes a partir de resíduos, uma vez que a dificuldade é encontrar uma composição química adequada que permita o crescimento celular e a produção de metabólitos secundários de interesse (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; CAMEOTRA & MAKKAR, 2010; ANTUNES et al., 2013).

A dificuldade em utilizar resíduos agroindustriais está em encontrar resíduos que possua composição adequada de nutrientes que permita o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse, portanto, geralmente é necessária a suplementação com meios minerais, devido que os resíduos não apresentam todos nutrientes necessários para o crescimento celular. Entretanto, encontrar meios minerais adequados para determinado coproduto de origem agroindustrial, é outra dificuldade, pois, os resíduos não apresentam uma padronização da sua composição, tendo assim necessidade de pesquisas a fim de identificar meio mineral adequado para o coproduto que pretende utilizar. O uso de coproduto de origem agroindustrial reduz os custos de produção tornando os biossurfactantes competitivo frente surfactantes químicos (NITSCHKE & PASTORE, 2003), sendo assim, estudos a fim de identificar meios minerais adequados para determinado resíduo são de grande importância.

Desse modo, como estratégia para a redução dos altos custos da produção industrial de biossurfactante, os subprodutos da agroindústria aparecem como promissoras fontes de carbono alternativas favorecendo, também, a minimização do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desses rejeitos no ambiente (Luna et al., 2009).

Por fim, visando estudar a influência de diferentes meios minerais na produção de biossurfactante a partir de fonte de carbono de baixo custo, resíduos de pescado, o propósito deste trabalho é de investigar em qual meio mineral os micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum* é capaz de produzir surfactantes biológicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima

O pescado (*Micropogonias furnieri*) foi adquirido no mercado público da cidade de Rio Grande, RS, e filetados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos – FURG. O resíduo então foi constituído de cabeça, vísceras, pele, ossos, escamas, entre outros. A fim de obter uma homogeneização destes resíduos, os mesmos passaram por uma despoldadeira. Para o processo fermentativo os resíduos foram diluídos em água destilada esterilizada na proporção de 1:5 (pescado:água).

2.2 Caracterização da matéria-prima

Para determinar a composição proximal do resíduo foram realizadas análises de proteína, lipídios, umidade e cinzas, de acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1995), e os carboidratos foram determinados por diferença.

2.3 Produção de biossurfactante

A produção de biossurfactantes foi realizada por cultivo submerso por 72 h, em Erlenmeyers de 500 mL a 200 rpm e 30 °C. Os meios de cultivos foram compostos por 3 meios minerais diferentes, sendo que cada um deste meios foi suplementado com uma fonte de carbono (resíduos de pescado). Os meios minerais utilizados foram: meio 1 composto por NaCl 0,6 g, Extrato de levedura 0,3 g e peptona 0,5 g para 1 L de água destilada (BARBOSA & PAZ, 2007); meio 2 composto somente por peptona 0,5g para 1 L de água destilada; e meio 3 composto 4 g NH₄NO₃; 4,0822 g KH₂PO₄; 0,0008 g CaCl₂; 10,7182 g Na₂HPO₄; 0,1971 g MgSO₄; 0,0011 g FeSO₄ e 0,0015 g EDTA em 1 L de água destilada (COOPER et al., 1987).

Para a produção dos biossurfactantes foi utilizado 10% da solução de 1:5 de pescado e água destilada e os micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Corynebacterium aquaticum* na concentração de 2% e o pH inicial do meio foi 7,0 (Tabela 1).

Tabela 1- Ensaio realizados para produção de biossurfactante

Ensaio	Composição dos meios
1	Resíduos de pescado + Meio 1 + <i>Bacillus subtilis</i>
2	Resíduos de pescado + Meio 1 + <i>Corynebacterium aquaticum</i>
3	Resíduos de pescado + Meio 2 + <i>Bacillus subtilis</i>
4	Resíduos de pescado + Meio 2 + <i>Corynebacterium aquaticum</i>
5	Resíduos de pescado + Meio 3 (sem micro-organismo)
6	Resíduos de pescado + Meio 3 + <i>Bacillus subtilis</i>
7	Resíduos de pescado + Meio 3 + <i>Corynebacterium aquaticum</i>

2.4 Determinações analíticas

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.4.1 Atividade emulsificante

A atividade emulsificante do meio foi analisada através da utilização de 3,5 mL de extrato e 2 mL de óleo de soja. Essa mistura foi para um agitador vortex a 700 rpm por 1 min. Após 24 h de repouso, foi realizada a leitura dos dados da relação entre a altura total do óleo e a altura do óleo emulsificado, caracterizando a atividade emulsificante água/óleo (BRODERICK & COONEY, 1982).

2.4.2 Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada por um tensiômetro (Kruss Processor Tensiometer K-9, Alemanha) através da utilização do método do anel Du Nouy. O tensiômetro determina as tensões superficiais com auxílio de um anel suspenso e de uma balança precisa. Neste método, o líquido é levantado até que o contato com a superfície do anel seja registrado. A amostra é então baixada, de maneira que o filme líquido produzido abaixo do anel esteja alongado. Como o filme líquido é estendido, uma força máxima é experimentada e medida, obtendo-se a tensão superficial. A tensão superficial foi medida com a amostra em contato com o ar (COSTA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006).

Antes de medir a tensão superficial, o meio de cultivo foi centrifugado a 6067 G por 15min.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 temos os valores de tensão superficiais obtidos durante todo o processo fermentativo.

Tabela 2- Tensões superficiais dos ensaios durante o processo fermentativo

Ensaio	0h (mN.m ⁻¹)	24h (mN.m ⁻¹)	48h (mN.m ⁻¹)	72h (mN.m ⁻¹)
1	41,63±0,10 ^{ab}	33,02±2,03 ^a	36,93±0,91 ^a	40,70±1,05 ^a
2	41,67±1,19 ^{ab}	34,88±1,90 ^{ab}	35,25±1,88 ^{ab}	38,97±1,99 ^{ab}
3	40,13±0,45 ^a	35,58±1,73 ^{abc}	41,97±1,38 ^{ac}	41,33±1,21 ^{abc}
4	40,47±1,79 ^{ab}	37,02±1,06 ^{bcd}	41,65±1,07 ^{acd}	38,92±1,77 ^{abcd}
5	41,7±1,57 ^{ab}	38,60±1,08 ^{cde}	37,87±1,47 ^{abcd}	37,23±0,68 ^{abcd}
6	40,43±0,42 ^{ab}	33,53±0,46 ^{abcd}	29,51±0,44 ^{be}	29,53±0,46 ^e
7	42,72±0,03 ^b	38,07±0,06 ^{bcd}	29,43±0,37 ^{be}	28,54±0,47 ^e

*Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Os ensaios que obtiveram os melhores resultados foram os que utilizaram o meio mineral 3, que são os ensaios 6 e 7. Nestes ensaios obteve-se uma redução de cerca 14 mN.m^{-1} da tensão superficial. Estes ensaios mostraram que os dois micro-organismos utilizados possuem capacidade de produzir biossurfactantes a partir deste meio mineral. É importante ressaltar que somente utilizando o meio mineral 3 somado aos resíduos de pescado e sem os micro-organismos, ensaio 5, não se obteve reduções significativas da tensão superficial, mostrando assim a importância dos micro-organismos na produção do surfactante biológico.

Os meios minerais 1 e 2, utilizando os mesmos micro-organismos, não apresentaram resultados satisfatórios quando comparados com o meio 3, o que provavelmente aconteceu é que o meio não continha os nutrientes adequados para que os micro-organismo produzissem o bioproduto desejado. Segundo Banat (1995), a produção de surfactante biológico é influenciada pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês no meio de produção.

Os resultados de tensão superficial encontrados nos ensaios 6 e 7 depois de 72 h de fermentação são muito promissores, pois, comparando estes resultados com a tensão do biossurfactante mais conhecido, a surfactina (27 mN/m) (BARROS et al., 2007), pode-se dizer que os resultados alcançados foram bastante satisfatórios.

Haba et al. (2000) utilizaram uma seleção de 36 micro-organismos para a produção de biossurfactantes em meio líquido de cultura contendo 2% de resíduo de óleo de oliva ou de girassol como fonte de carbono e conseguiram resultados finais de 40 mN.m^{-1} .

De acordo com Haba et al. (2000) e Batista et al. (2006), o critério utilizado para selecionar os micro-organismos produtores de biossurfactantes é a habilidade de reduzir a tensão superficial para valores inferiores a 40 mN.m^{-1} . Portanto, os micro-organismos utilizados juntamente com os meios minerais avaliados, apresentam-se como bons produtores de biossurfactantes, pois vários dos ensaios ficaram abaixo de 40 mN/m .

A Tabela 3 apresenta as atividades emulsificantes dos ensaios realizados com os diferentes meios minerais.

Tabela 3- Atividades emulsificantes água/óleo durante o processo fermentativo

Cultivos	0h	24h	48h	72h
1	40,83+1,17 ^a	45,83+1,89 ^a	50,90+0,01 ^a	51,24+0,60 ^a
2	42,52+2,18 ^a	43,81+0,68 ^{ab}	48,25+3,70 ^{ab}	50,00+2,61 ^{ab}
3	40,99+1,24 ^a	45,88+1,25 ^{abc}	45,63+3,90 ^{ab}	46,14+2,93 ^{abc}
4	41,00+1,27 ^a	49,16+1,18 ^{abcd}	48,26+1,25 ^{ab}	41,27+2,73 ^{abcd}
5	41,59+2,27 ^a	42,73+0,19 ^{abcde}	47,45+0,64 ^{ab}	40,93+1,32 ^{cde}
6	53,18+2,50 ^b	54,49+0,70 ^{acde}	39,10+0,15 ^b	42,45+0,64 ^{bcdef}
7	36,05+0,07 ^a	33,13+0,19 ^f	41,44+0,06 ^{ab}	37,63+0,09 ^{cdef}

*Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem ($p>0,05$) pelo teste Tukey.

Outra habilidade que Haba et al. (2000) e Batista et al. (2006) relatam é que a atividade emulsificante deve ficar em torno de 50%. Porém, somente o ensaio 1 e 2 obtiveram atividade emulsificante próxima ou superior a 50%, sendo que os outros ensaios obtiveram valores inferiores a 50% (Tabela 3). Neste contexto, cabe destacar que Chen et al. (2007) em seus estudos afirma existirem biossurfactantes que podem estabilizar (emulsificantes) e outros que podem desestabilizar (desemulsificantes) as emulsões, o que poderia justificar em parte o fato dos ensaios que obtiveram menor tensão apresentarem menores valores de atividade emulsificante.

Bueno et al. (2010) utilizando *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilis* em substrato com óleo diesel, obtiveram após 72 h fermentação 11,11% de atividade emulsificante para *Bacillus subtilis* e 44,40% para o *Bacillus pumilis*. Estes resultados mostram que existe uma grande variabilidade com relação a atividade emulsificante, sendo esta dependente dos tipos de biossurfactantes que estão sendo produzidos no meio de cultivo.

Por fim, o fato de estudar a produção de surfactantes biológicos através de diferentes meios minerais se mostrou bastante interessante, pois foi possível verificar grandes diferenças entre os mesmos, e, portanto, permitiu selecionar o meio mineral que propiciou as melhores condições para produção de biossurfactantes a partir de resíduos de pescado, consequentemente obtendo avanços nos estudos da produção de biossurfactantes a partir de fontes alternativas.

4. CONCLUSÕES

O meio mineral 3, juntamente com os resíduos de corvina mostraram-se promissores para a produção de biossurfactantes, pois apresentaram baixa tensão superficial. Dessa forma, o uso de resíduos agroindustriais apresenta grandes vantagens na produção de biossurfactantes por causa da redução dos custos, tornando-se assim mais rentáveis e com isso gerando um apelo comercial maior em relação aos surfactantes químicos.

As propriedades de redução da tensão superficial dos biossurfactantes obtidos indicam perspectivas futuras para a aplicação dos mesmos em processos de biorremediação, emulsificação, recuperação melhorada do petróleo, remoção de resinas, entre outras aplicações industriais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul – FAPERGS, pelo apoio financeiro; e aos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos (LTA) e Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pelo apoio técnico e disponibilidade da estrutura física.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. A.; ARAÚJO, H. W. C. de; SILVA, C. A. A. da; ALBUQUERQUE, C. D. da C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por

Chromobacterium violaceum ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. Arquivos do Instituto Biológico, v.80, n.3, p. 334-341, 2013.

AOAC. Official Methods of Analysis of International. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BANAT, I. M. Biosurfactants characterization and use in pollution removal: State of the art. A review. Acta Biotechnologica, v.15, p.251-67, 1995.

BARBOSA, M. M. C.; PAZ, M. C. de F. Produção de biossurfactantes por *chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal (óleo de pequi). In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. de; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. Bioresource Technology, v.97, n.6, p.868-875, 2006.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. Revista de Microbiologia, v. 30, p. 231–236, 1999.

BRODERICK L. S.; COONEY J. J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. Developments in Industrial Microbiology. v.23, p.425-434, 1982.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. Química Nova. v.33, n.7, p.1572-1577, 2010.

CAMEOTRA S. S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. Pure Applied Chemistry, v.82, n.1, p.97-116, 2010.

CHEN, S. Y.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Repeated pH- stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. Applied Microbiology Biotechnology, v.76, n.1, p.67-74, 2007.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. Applied and Environmental Microbiology. v.53, n.2, p.224-229, 1987.

COSTA, R. J., PEREIRA, M. R., NASCIMENTO, D. S. Biorremediação de ambientes aquático e terrestre utilizando biossurfactante produzido através de fermentação em estado sólido. Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. Journal Applied Microbiology, v.88, p.379-387, 2000.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactants of MEL – A increase gene transfection mediated by cationic liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 289, p. 57-61, 2001.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. Bangalore: *Current Science*, v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

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*, v.58, n.4, p.428-34, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*. v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*. v.28, p.109-116, 2006.