

ESTABILIDADE DE BIOSSURFACTANTE BACTERIANO DO TIPO LIPOPEPTÍDEO FRENTE ÀS VARIAÇÕES DE TEMPERATURA, pH E CONCENTRAÇÕES SALINAS

B. N. SANTOS¹, J. A. M. LEMOS¹, S. LEMOS², A. PARENTE¹, Í. W. L. DE FRANÇA¹, V. M. M. MELO³, H. BATISTA¹ e L. R. B. GONÇALVES¹

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos

³ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Biologia

Email para contato: lrg@ufc.br

RESUMO - Recentemente, têm-se dado grande ênfase aos impactos ambientais causados pelos surfactantes químicos. Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em metabólicos microbianos. A aplicabilidade de biossurfactantes em biorremediação e diversos setores industriais dependem da estabilidade de suas propriedades funcionais. Os objetivos deste estudo foram avaliar a estabilidade das ações tensoativa e emulsificante do biossurfactante produzido pela cepa ICA56, frente às variações ambientais de pH, temperatura e força iônica. As propriedades emulsificante e tensoativa do bioproduto produzido no cultivo da cepa ICA56 mostraram-se estáveis e eficientes frente às variações de pH, temperatura e força iônica, mostrando sua aplicabilidade. Dentre as condições avaliadas, o pH mostrou-se o que mais apresentou efeito sobre as propriedades do biossurfactante. Este bioproduto foi ainda efetivo como tensoativo e emulsificante, mas com eficiência reduzida para pH inferior a 4.

1. INTRODUÇÃO

Biossurfactantes constituem uma série de espécies químicas com propriedades tensoativas similares aos surfactantes químicos. São produzidos extracelularmente ou como parte da membrana celular de bactérias, leveduras e fungos e apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes químicos: baixa toxicidade, aceitabilidade ambiental, biodegradabilidade no solo e na água, possibilidade de produção por fontes renováveis, além de tolerância às condições extremas de temperatura, pH e força iônica, e serem biodegradáveis no solo e na água. Os biossurfactantes são mais eficientes do que os surfactantes sintéticos, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de tensoativo (AL-BHARY *et al.* 2013; REIS *et al.* 2013).

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, separação, solubilização, inibição de corrosão, agente quelante, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial.

Estas propriedades funcionais de cada biossurfactante podem variar dependendo do meio de cultivo e micro-organismo utilizados, bem como das condições operacionais, tais como pH, temperatura, agitação e aeração do sistema reacional (REIS *et al.* 2013). A aplicabilidade de um biossurfactante depende da sua estabilidade de propriedades funcionais frente a variações de condições ambientais. Segundo Vaz *et al.* (2012), os biossurfactantes apresentam propriedades que os caracterizam como potenciais insumos em diversos setores e processos industriais. Estes processos estão normalmente associados a condições extremas (tais como pH, temperatura ou salinidade), sendo então necessária uma avaliação da estabilidade desses biossurfactantes frente a essas condições. Alguns campos de aplicação dos biossurfactantes dependem estritamente que suas propriedades funcionais permaneçam praticamente inalteradas frente às variações ambientais em que está sujeito, tais como temperatura, pH e concentração salina.

Dentro deste panorama, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as propriedades funcionais, tais como emulsificante e tensoativa, do biossurfactante produzido pela cepa ICA56 frente a variações de pH, concentração salina e temperatura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e meio de estoque

A cepa ICA56 foi previamente isolada de manguezal no município de Icapuí (Barra Grande) no estado do Ceará. Este micro-organismo foi apresentado como potencial produtor de biossurfactante por Lima (2013), por intermédio da identificação do gene *sfp*, responsável pela produção de surfactina, através de técnica de *PCR* (Reação em Cadeia da Polimerase). Esta linhagem pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará e foi gentilmente cedida para a realização do presente estudo. A linhagem foi mantida em meio APGE (água/peptona/glicose/extrato de levedura) e repicada a cada 30 dias.

2.2 Produção e obtenção do biossurfactante bruto

A cepa ICA56 foi cultivada em meio mineral (BARRETO, 2011) contendo glicose ($10,0 \text{ g.L}^{-1}$) como fonte de carbono e sulfato de amônio ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) como fonte de nitrogênio. Para a realização dos ensaios, adicionou-se (10% de inóculo) ao meio de cultivo, para um volume final de fermentação de 100 mL. O ensaio foi realizado em agitador orbital a 30°C e 180 rpm, durante 48 horas. Após o período de cultivo, a biomassa foi removida por centrifugação a 10000 g, a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi acidificado para pH 2,0 com HCl 3M. A solução resultante permaneceu em repouso por aproximadamente 24 horas (4°C) para que ocorresse a precipitação do biossurfactante. O extrato rico em biossurfactante foi centrifugado (10000 g, a 4°C por 15 minutos) e o precipitado obtido foi conduzido para estufa de secagem (50°C , por 24 horas), fornecendo assim o biossurfactante bruto (PERREIRA *et al.* 2013).

2.3 Caracterização das propriedades funcionais do biossurfactante produzido pela cepa ICA56 em meio mineral

Tensão superficial e interfacial: Utilizou-se Tensiômetro Krüss, modelo K6, de acordo com o método descrito por Costa *et al.* (2006).

Índice de emulsificação: O índice de emulsificação foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Wei *et al.* (2005). As fontes hidrofóbicas utilizadas na formulação da emulsão foram óleo de soja e óleo de motor SAE 15W-40. Analisou-se a estabilidade da emulsão formada em período de 24 horas.

2.4 Estabilidade frente variações de pH, temperatura e concentrações salinas

A avaliação da estabilidade das propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante bruto foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Aparna *et al.* (2012). Foram preparadas soluções do biossurfactante bruto ($0,35 \text{ mg.mL}^{-1}$) e então expostas às variadas de condições de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12), temperatura (4, 25, 50, 75, 100 e 121°C , por 30 minutos de exposição em mufla) e concentrações salinas (0; 2,5; 5, 10, 15 e 20% m/v de NaCl). Posteriormente foram avaliados o índice de emulsificação (E_{24}), utilizando óleo de motor e óleo de soja, bem como as tensões superficiais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 17 apresenta o efeito da variação do pH nas propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante produzido pela cepa ICA56.

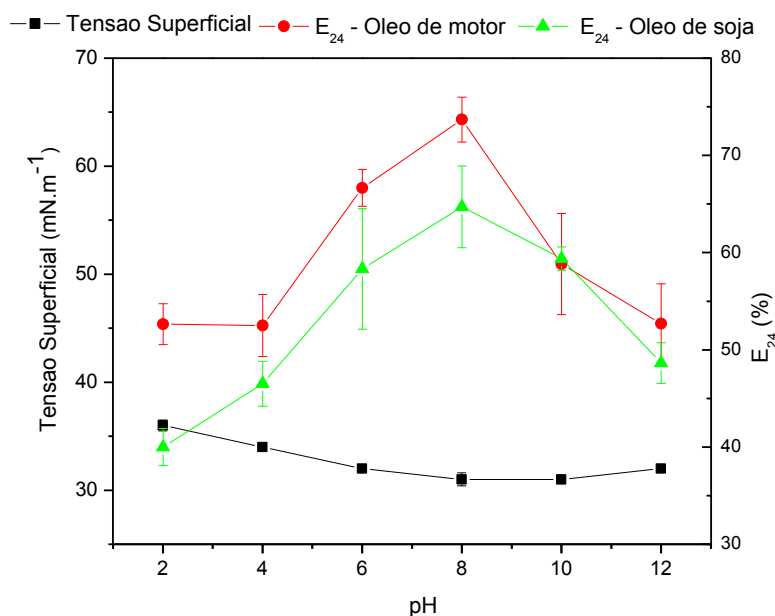


Figura 1 – Efeito da variação do pH no Índice de Emulsificação (E_{24}) na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) no biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.

Observa-se na Figura 1 que o biossurfactante produzido apresentou menor valores de tensão superficial e maiores resultados de índice de emulsificação na faixa de pH de 6,0 a 10,0. No pH 8,0 o biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 31 mN.m^{-1} , representando um redução de aproximadamente 57%. Este resultado nesta faixa de pH era esperado, tendo em vista as características do biossurfactante produzido, pois em pH mais próximos à neutralidade (pH 7,0), a surfactina permanece solubilizada em solução, mantendo suas propriedades tensoativas e emulsificantes. Apesar de que na faixa mais próxima da neutralidade, em todos os valores de pH estudados, a tensão superficial, permaneceu inferior a 37 mN.m^{-1} .

Quando se avaliou o índice de emulsificação frente a óleo de motor, observou-se que em todas as faixas de pH analisados, os valores de E_{24} foram superiores a 50 %, indicando a eficiência do tensoativo produzido. Este resultado de estabilidade na emulsão formada também foi observado quando se utilizou óleo de soja, exceto para os pH de 2,0 e 4,0.

Valores consideravelmente ácidos do meio causam a precipitação da surfactina, causando possível perda desse produto. Devido à presença dos ácidos glutâmico e aspártico (aminoácidos) na estrutura da surfactina, o contato com HCl, ou outro ácido, causa a protonação da cadeia lateral destes aminoácidos, tornando a surfactina insolúvel em meio aquoso (GUDINA *et al.* 2010). Valores acentuadamente ácidos de pH podem causar alterações nas forças eletrostáticas envolvidas na formação de emulsões, o que pode acarretar a coalescência (separação) das fases envolvidas.

A variação do pH no meio pode também afetar a estrutura e o tamanho das micelas formadas entre o biossurfactante e o sistema água-óleo. Knoblich *et al.* (1995) observaram que a variação do pH alterou o tamanho e o formato das micelas produzidas pela surfactina. Nos valores de pH mais próximos a neutralidade, a micela apresenta uma estrutura globular e elipsoidal. Já em condições mais alcalinas, a estrutura passava para um formato globular e cilíndrico e com tamanho maior do que em pH mais ácidos ou neutros. Um tamanho de micela maior pode agregar uma maior quantidade material de um sistema água-óleo.

Os resultados de estabilidade do biossurfactante, frente a variações de pH, foram semelhantes aos reportados por Al-Bahry *et al.* (2013) e Al-Wahaibi *et al.* (2013).

A fim de se analisar o efeito da temperatura nas propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante em estudo, alíquotas de solução do biossurfactante bruto foram expostas à diferentes temperaturas (4, 25, 50, 75, 100 e 121 °C) por 30 minutos. A Figura 2 apresenta o efeito da variação da temperatura no índice de emulsificação (E_{24}) na emulsão formada em óleo de motor e óleo de soja, e na tensão superficial de solução rica em biossurfactante bruto.

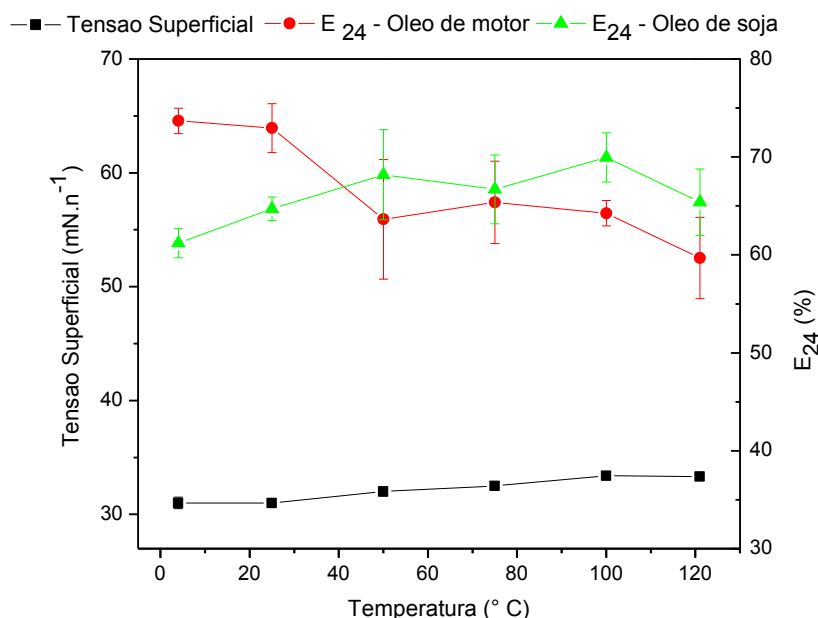


Figura 2 – Efeito da variação da temperatura no Índice de Emulsificação(E_{24}) na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) no biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.

A Figura 2 mostra que apesar do tratamento térmico na solução rica em biossurfactante bruto, tanto as propriedades tensoativas como emulsificantes não apresentaram mudanças significativas nas temperaturas de 4 a 120 °C.

A tensão superficial da solução de biossurfactante permaneceu na faixa entre 31 e 33 mN.m⁻¹, mostrando a estabilidade da atividade superficial do tensoativo produzido frente as variações de temperaturas analisadas. As emulsões analisadas em óleo de motor e óleo de soja também apresentaram estabilidade apresentando valores de índice de emulsificação entre 60 e 75% para a faixa de temperatura analisada.

Diversos estudos confirmam a estabilidade das propriedades dos biossurfactantes quando submetidos a condições extremas de temperatura. Joshi *et al.* (2008) reportaram que os biossurfactantes produzido por 4 cepas de *Bacillus sp.* permaneceram com suas propriedades estáveis, quando submetidos à 80 °C durante nove dias. Vaz *et al.* (2012) também observaram a estabilidade do biossurfactante produzido por cepas de *Bacillus sp.*, isolada de ambiente contaminado com petróleo, quando submetidos a condições extremas de temperatura.

Segundo Khopade *et al.* (2012), a estabilidade térmica de um biossurfactante é um resultado interessante no que se relaciona a aplicabilidade de um produto. Em alguns setores industriais a estabilidade térmica é um fator crucial, tais como nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, em que há necessidade de estilização de certos produtos por tratamento térmico.

O efeito da adição de NaCl (a de 0 a 20 % m/v) à uma solução rica em biossurfactante também foi analisado, em termos de tensão superficial e índice de emulsificação. A Figura 3 apresenta os resultados deste estudo.

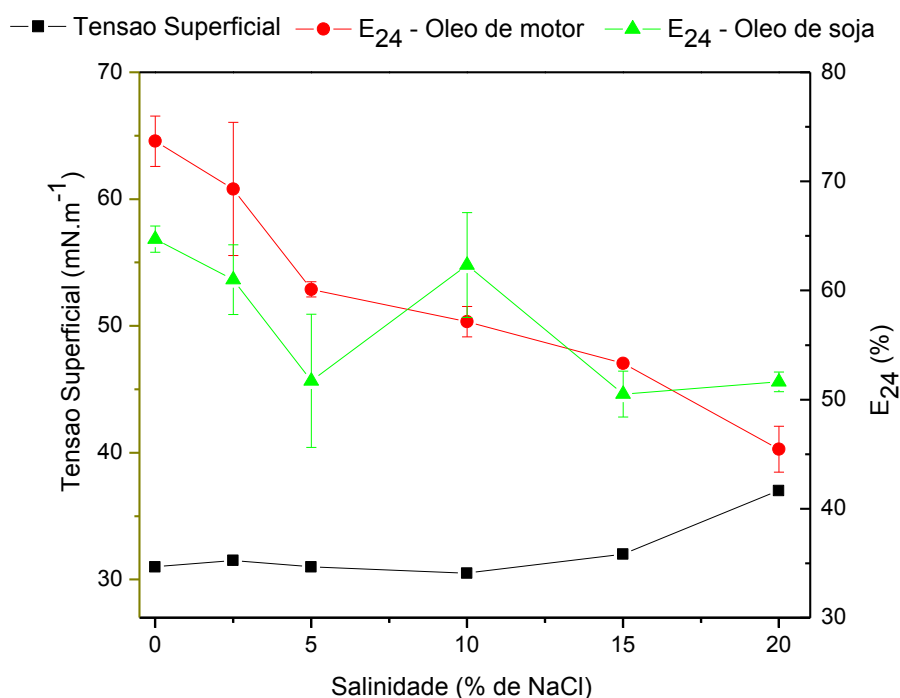


Figura 3 – Efeito da variação da força iônica no Índice de Emulsificação(E₂₄) na emulsão formada em óleo de motor (●) e óleo de soja (▲) e na atividade superficial (■) do biossurfactante produzido pelo cultivo da cepa ICA56 em meio mineral.

Observou-se que os índices de emulsificação apresentaram um decréscimo à medida que a concentração salina foi aumentada. Entretanto a maioria dos valores de E₂₄ permaneceu superior a 50 %, indicando a eficiência do biossurfactante. A emulsão

formada em óleo de soja apresentou maior estabilidade, frente à variação de força iônica, do que a formada em óleo de motor. Na maior concentração analisada (20% m/v) a emulsão formada em óleo de motor apresentou índice de emulsificação de aproximadamente 45%, apresentando indícios que para esta concentração salina, o biossurfactante analisado não apresente a mesma eficiência como emulsificante, do que nas outras analisadas.

Já a tensão superficial não apresentou variação tão significativa, permanecendo estável em uma faixa entre 31 e 32 mN.m⁻¹, com exceção para a concentração de 20 % de NaCl, cuja solução apresentou tensão de 37 mN.m⁻¹. Este resultado reforça a possibilidade que para esta concentração salina, a eficiência do biossurfactante seja levemente reduzida. Apesar do suave aumento na tensão superficial na concentração de NaCl mais elevada, o biossurfactante produzido ainda foi capaz de reduzir cerca de 48% na tensão superficial. Até 10% de salinidade, foi observada variação insignificante nas propriedades tensoativas do biossurfactante produzido. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl enquanto que concentrações salina de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Knoblich *et al.* (1995) observaram que a adição de sal a solução de surfactina provoca uma mudança no tamanho da micela formada. Elevadas concentrações salinas podem diminuir consideravelmente o tamanho da micela e afetar as propriedades funcionais deste biossurfactante.

Shaw (1970) propõe que os sais iônicos formam interações íon-dipolo com a água. Estas interações são mais fortes do que as formadas entre o sal e a fase gasosa (ar), e estas moléculas evitam a interface ar/sistema aquoso, gerando um aumento na tensão superficial de uma solução.

Segundo Mohamed *et al.* (2003), com o aumento da concentração salina, também é observado um aumento na energia livre do sistema. Então as emulsões formadas não são termodinamicamente estáveis, proporcionando um aumento na taxa de coalescência das gotas e posterior separação de fases.

Al-Bahry *et al.* (2013) e Al-Wahaib *et al.* (2013) reportaram que o biossurfactante produzido por cepas de *Bacillus sp.* apresentou estabilidade tensoativa até 5% de salinidade. Felix (2012) também observou tensão de 37 mN.m⁻¹ para solução rica em surfactina com 20% de NaCl (m/v) e que o biossurfactante permaneceu estável até 10% de salinidade, ao avaliar a produção de surfactina pelo cultivo da cepa de *Bacillus subtilis* LAMI005 em suco de caju clarificado.

Khopade *et al.* (2012) propõem que biossurfactantes que suportem até 10% de salinidade apresentam viabilidade à utilização na biorremediação de ambientes marinhos.

4. CONCLUSÃO

As propriedades emulsificante e tensoativas do bioproduto formado no cultivo da cepa ICA56 mostraram-se estáveis e eficientes frente às variações de pH, temperatura e concentração salina, mostrando sua aplicabilidade, já que diversas de suas aplicações dependem destas características. Dentre as condições avaliadas, o pH mostrou-se o que mais apresentou algum efeito sobre as propriedades do biossurfactante, mas ainda assim este bioproduto foi efetivo como tensoativo e emulsificante, mas com eficiência reduzida em valores ácidos de pH (inferiores a 4). Esta estabilidade de suas propriedades funcionais mostra indícios do potencial de aplicabilidade do biossurfactante produzido pela cepa ICA56.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-BAHRY, N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery, **International Biodeterioration Biodegradation**, vol.81, p.141–146, 2013.

AL-WAHAIBI, Y.; SANKET, J.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL B., Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-333, 2013.

APARNA, A; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B, **Colloids and Surfaces B**, vol. 95, p. 23–29, 2012.

BARRETO, R. V. G., **Prospecção de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes em solos de manguezais**, 2011. Tese (Doutorado em Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) Universidade Federal do Ceará, 2011.

COSTA, S. G. V. A. O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LB1 rhamnolipids following growth on brazilian native oils. **Proc. Biochem.**, v. 41, p. 483 – 488, 2006.

FELIX, A. K. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir de suco de caju**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC) Fortaleza – Ceará, 2012.

GUDINA, E. J.; TEIXEIRA J, A.; RODRIGUES L. R.; Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*, **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 76 (1) p. 298-304, 2010.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; A. J. DESAI. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions, **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 195–199, 2008.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, p. 311-318, 2012.

KNOBLICH, A.; MATSUMOTO, M.; ISHIGURO, R.; MURATA, K.; FUJIYOSHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M., Electron Cryo-Microscopic Studies on Micellar Shape and Size of Surfactin, an Anionic Lipopeptide. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 5 (1-2) p. 43-48, 1995.

LIMA, L. B., **Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará**, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MOHAMED, A. O.; GAMAL, M.; ZEKRI, A. Y. Effect of salinity and temperature on water cut determination in oil reservoirs, **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 40, .p 177-188, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R.; Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications, **Fuel**, v. 111, p. 259-268, 2013.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: Production and Applications, **Biodegradation - Life of Science**, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, 2013, v. 01, p. 1-370, 2013.

SHAW, D. J. **Introduction to colloids and surface chemistry**. Editora Edgar Blucher Ltda, p. 181, 1970.

VAZ, D. A.; GUDIÑA, E. J.; ALAMEDA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 167-174, 2012.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.