

O ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS AMAZÔNICOS

STUDY OF BIOSURFACTANTS PRODUCTION BY AMAZON FUNGI

D. D. F. PEREIRA¹, S. DUVOISIN JR¹ e P. M. ALBUQUERQUE¹

¹ Universidade do Estado do Amazonas – UEA-EST., Departamento de Engenharia
E-mail: danieell_123@hotmail.com

article info

Article history:

Received 20 May 2016

Accepted 3 January 2017

Available online 27 July 2017

PALAVRAS-CHAVE: Surfactantes; Fungico; Tensão Superficial; Índice de Emulsificação.

KEYWORDS: Surfactants; Fungi; Surface Tension, Emulsification.

RESUMO: *Os biossurfactantes são surfactantes de origem microbiana. São moléculas anfipáticas, capazes de reduzir a tensão superficial, com inúmeras aplicações industriais. Neste estudo avaliou-se a produção de biossurfactantes de fungos amazônicos. Os fungos UEA_115 e UEA_105 foram semeados em meio líquido, acrescido de óleo de soja e cultivados em shaker. O índice de emulsificação foi realizado na presença de querosene e as medidas de tensão superficial do meio de cultivo foram realizadas em um tensiômetro. Após 30 dias de cultivo extraíram-se 1,80 g/L de moléculas tensoativas para o fungo UEA_115 e 0,64 g/L para o UEA_105. Analisaram-se as propriedades físico-químicas do UEA_115 em razão da maior quantidade de biossurfactante obtida. O índice de emulsificação do meio líquido foi de 62,41%. A tensão superficial do meio de cultivo passou de 62,2 mN/m para 41,47 mN/m, ou seja, verificou-se uma redução de 33,3%. A concentração micelar crítica (CMC) encontrada foi de 7,287 mg/mL.*

ABSTRACT: *Biosurfactants are surfactants obtained by microorganisms. These amphipathic molecules are capable of reducing the surface tension, which give them many industrial applications. In this study we evaluated the production of biosurfactants of Amazonian fungi. The UEA_115 and UEA_105 fungi were grown in liquid medium plus soybean oil and cultivated in shaker. The emulsification index was conducted in the presence of kerosene and surface tension measurements of the culture medium were carried out in a tensiometer. After 30 days of culture, 1.80 g / L of surfactant molecules for the fungus UEA_115 were extracted and 0.64 g / L for UEA_105. Analyzed the physicochemical properties of UEA_115 due to the greater amount of biosurfactant obtained. The emulsification index of the liquid medium was 62.41%. The surface tension of the medium increased from 62.2 mN / m to 41.47 mN / m. Hence there was a reduction of 33.3%. The critical micelle concentration (CMC) was found to be 7.287 mg / ml.*

1. INTRODUÇÃO

Os tensoativos, ou surfactantes, são moléculas anfifílicas naturais ou sintéticas, por possuírem na sua estrutura duas regiões de polaridade distintas: uma “cabeça” polar (hidrofílica) e uma “cauda” apolar (hidrofóbica). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfótera. Devido às suas estruturas e propriedades, substâncias tensoativas em presença de água e óleo, adsorvem-se nas interfaces orientando-se de forma que o grupo polar fique voltado para a fase aquosa, e o grupo apolar para a fase oleosa, formando um

filme molecular Óleo/Água (Fase aquosa/ Fase oleosa) ordenado nas interfaces, que depende da natureza dos grupos hidrofílico e lipofílico, e que resulta na redução das tensões interfacial e superficial na interface água/ar (HUNTER, 1992; ROSSI *et al.*, 2006). Desta forma, os surfactantes possuem diversas aplicações industriais, tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (MULLIGAN, 2005). A maior utilização dos surfactantes se dá na indústria de produtos de limpeza (sabão e detergentes), petróleo, cosméticos e de produtos de higiene (JÖNSSON *et al.*, 2003; ARAÚJO, 2002).

Na gota de um líquido, as moléculas no interior estão envolvidas por outras moléculas da mesma substância, ou seja, as forças intermoleculares são equilibradas uma vez que atuam em todas as direções. Entretanto, as moléculas que estão na superfície não estão totalmente envolvidas por moléculas da mesma espécie, e estão sob efeito de uma força resultante que origina a chamada Tensão Superficial (BECHER, 1965). A eficácia dos surfactantes é definida através da capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (MULLIGAN, 2005).

Uma das propriedades fundamentais dos tensoativos é a propriedade de adsorção nas interfaces (limite entre duas fases imiscíveis) ou superfícies de um dado sistema. As propriedades físico-químicas de tensoativos, na sua grande maioria, não variam significativamente, mesmo em baixas concentrações. No entanto, para uma dada concentração específica de tensoativo, conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC), ocorre uma alteração nestas propriedades. Abaixo da CMC, as moléculas de tensoativo estão predominantemente na forma de monômeros dispersos e acima, estão presentes na forma de agregados coloidais termodinamicamente estáveis, as micelas. Este processo de formação é conhecido como micelização e depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-íons, temperatura, etc), e tal fenômeno pode causar variações de diversas propriedades físico-químicas como detergência, tensão superficial, tensão interfacial, condutividade iônica e pressão osmótica (ROSSI, 2006). Um dos índices mais utilizados para avaliar a eficiência de um surfactante é a concentração micelar crítica (CMC), a concentração mínima de surfactante requerida para alcançar os valores mais baixos de tensão interfacial ou de tensão superficial (Lin, 1996), visto que a partir dessa concentração, não ocorrerá maior redução na tensão superficial ou interfacial (Maier, 2003).

Os biosurfactantes pertencem à classe de surfactantes naturais, obtidos a partir do metabolismo secundário de uma grande variedade de microorganismos. A obtenção de biosurfactantes fúngicos é pouco descrita, sendo a grande maioria dos estudos voltados para tensoativos produzidos por bactérias, sendo as mais reportadas dos gêneros: *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* e *Arthrobacter sp.* Entretanto, alguns trabalhos demonstram a possibilidade de utilizar fungos na produção destes compostos (CASTIGLIONI *et al.*, 2009; KANNAHI e SHERLEY, 2012; SILVA *et al.*, 2014).

As principais classes de biosurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (GAUTAM, 2006). Contudo, Alguns autores preferem agrupar os

biossurfactantes de acordo com seu peso molecular, pois de modo geral, as moléculas de baixa massa molecular reduzem a tensão superficial de forma mais eficiente, enquanto as de alta massa molecular se caracterizam por formar emulsões de sistemas óleo/água mais estáveis.

Estes compostos apresentam diversas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, principalmente devido ao aumento da preocupação ambiental, e apesar de não serem competitivos do ponto de vista econômico, há uma tendência de substituição destes surfactantes sintéticos por biossurfactantes para suprir a demanda industrial, pois o mercado mundial dos surfactantes corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano, sendo grande maioria dos surfactantes sintéticos derivados do petróleo (KIM, 2000).

Algumas vantagens são: atividades superficiais e interfaciais mais efetivas, sendo estes mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações; maior tolerância a temperatura, pH e força iônica, de forma que muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas; biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos; além de baixa toxicidade, que é de grande interesse de indústrias de produtos de limpeza e cosméticos, devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; e sua baixa toxicidade também permite uma maior utilização em alimentos, e produtos farmacêuticos. (NITSCHKE e PASTORE, 2002; JOSHI *et al.*, 2008).

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida através da presença de compostos lipídicos, por variações de pH, temperatura, aeração e agitação ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse como baixas concentrações de nitrogênio e alterações nas condições ótimas de pH e temperatura (ÚBEDA, 2004). Quando são excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e transposição de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, a medida que o uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se desejam propriedades específicas para uma aplicação direcionada, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Assim, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência (REISER *et al.*, 1989)

Considerando o potencial dos fungos de produzir biossurfactantes e a importância desses compostos para diversos processos industriais, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de biossurfactantes utilizando fungos isolado da Região Amazônica, bem como caracterizar suas propriedades físico-químicas.

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismo

Os fungos UEA_115 e UEA_105, degradadores de madeira isolados da Região Amazônica, foram reativados e cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SB). As placas foram levadas à incubadora tipo BOD e mantidas a uma temperatura de 28°C por cerca de 5 a 7 dias, tempo necessário para o crescimento dos fungos.

2.2 Cultivo em Meio Líquido

Preparou-se o meio líquido descrito por Jacobucci (2000), composto por MgSO₄ (0,5 g/L), Na₂HPO₄ (3,0 g/L), KH₂PO₄ (1,0 g/L) e extrato de levedura (1,3 g/L) em frascos erlenmeyer de 150 mL. Após autoclavagem, 0,5 g/L de óleo de soja foram adicionados. Em seguida inocularam-se dois fragmentos de micélio em meio SB com 6 x 6 mm, diretamente no meio líquido. Os fungos foram cultivados em incubadora tipo shaker a 28°C sob agitação constante de 170 rpm, durante 30 dias.

O fungo que apresentou maior rendimento na extração de biossurfactantes foi cultivado novamente em 1L de meio para a caracterização físico-química das moléculas tensoativas, sendo retiradas alíquotas do meio a cada 6 dias para análise da tensão superficial. O índice de emulsificação foi determinado em uma alíquota retirada ao final do cultivo.

2.3 Determinação do Índice de Emulsificação

Uma mistura de 6 mL de querosene e 4 mL do meio filtrado foi agitada em vortex durante 2 minutos. Após 24 horas, o índice de emulsificação (E₂₄) foi calculado, dividindo-se a medida da altura da camada de emulsão pela altura total da mistura, vezes 100, conforme a equação 1 (PORNUNTHORNTAWEE et al., 2008). Para fins de comparação, determinou-se também o índice de emulsificação do surfactante sintético dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1%. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$E_{24\%} = 100 \frac{he}{ht} \quad (1)$$

2.4 Determinação da Tensão Superficial e Cálculo da Cmc

A tensão superficial foi medida utilizando-se um tensiômetro de anel (Krüss), através do método de Du Nouy, à temperatura ambiente (22 a 25°C).

A Concentração Micelar Crítica (CMC) foi determinada construindo-se o gráfico da tensão superficial versus diferentes concentrações do biossurfactante, após ser extraído do meio de cultivo. O ponto central de inflexão da curva determina a CMC (SHEPPARD e MULLIGAN, 1987). As medidas foram realizadas em triplicata.

2.5 Extração das Moléculas Tensoativas

Os compostos tensoativos foram isolados do meio de cultura livre de células utilizando a precipitação com etanol como método de extração. O caldo livre de células foi misturado com quatro volumes de etanol a frio (1: 4 v/v) e mantido a 4°C durante 48 h. O precipitado formado foi coletado por centrifugação a 5000 rpm durante 20 min e tratado com clorofórmio-metanol (2:1, v/v), a fim de remover os óleos residuais, e seco a 60° C, até que o peso se tornasse constante (MONTEIRO et al., 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração dos Biossurfactantes

Utilizando-se o método de extração com etanol foram obtidos 1,80 g/L de moléculas tensoativas para o microrganismo UEA_115 e 0,64 g/L para o UEA_105. A produção ficou abaixo do esperado, tendo em vista que no trabalho de Mukherjee *et al.* (2006), onde também foi utilizado o óleo de soja como fonte de carbono no cultivo dos fungos, os autores obtiveram um rendimento para os biossurfactantes produzidos entre 2,98 e 4,31 g/L. Em um trabalho recente, Silva (2015) reportou rendimento de 4,47 g/L de biossurfactante, utilizando o fungo do gênero *Aspergillus* em óleo de soja.

Considerando a maior produção de moléculas tensoativas pelo fungo UEA 115, este foi utilizado nas etapas seguintes, de produção em maior escala e caracterização físico-química dos biossurfactantes.

3.2 Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação do meio de cultivo do fungo UEA_115 cultivado durante 30 dias, na presença do solvente querosene foi, em média, de 62,4%. Isto indica que o biossurfactante produzido possui uma boa capacidade emulsificante, similar aos valores encontrados em trabalhos realizados por Monteiro *et al.* (2010), que utilizaram *Geotrichum* sp. e obtiveram E₂₄ de 77,8%, e por Kumar *et al.* (2008), com *Pseudomonas aeruginosa*, onde o E₂₄ foi de 56%. O índice de emulsificação do SDS a 1% foi de 88%.

3.3 Tensão Superficial

As medidas de tensão superficial para o meio líquido ao longo do tempo de cultivo fúngico estão apresentadas na Figura 1.

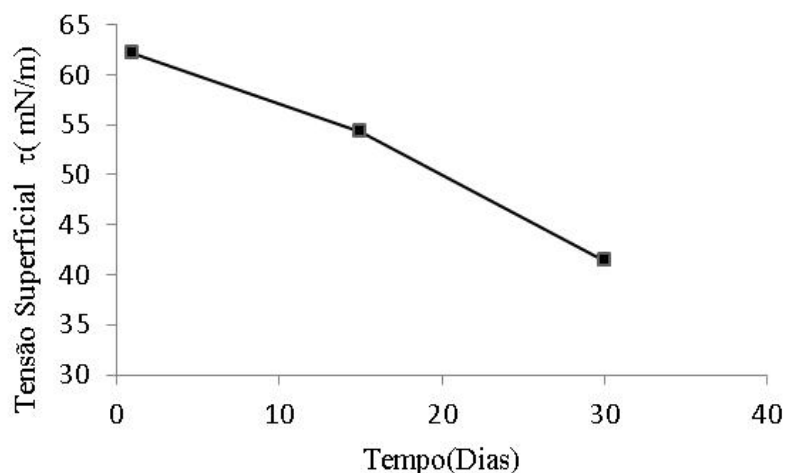


Figura 1 - Tensão superficial do meio líquido em função do tempo de cultivo do fungo UEA_115.

Inicialmente, a tensão superficial do meio líquido apresentou um valor de 62,2 mN/m e ao final do cultivo (trigésimo dia), registrou-se uma tensão superficial média de 41,47 mN/m. Portanto, houve uma redução de 33,3% na tensão superficial após os trinta dias de cultivo, o que confirma a produção de moléculas tensoativas.

Segundo Haba *et al.* (2000), os microrganismos ditos bons produtores de biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial a 40 mN.m⁻¹ ou menos. Verifica-se que o fungo UEA_115 possui potencial para reduzir a tensão superficial a este valor, mediante estudos de otimização do meio de cultivo e controle do bioprocessos.

3.4 Cálculo da CMC

A partir do biossurfactante extraído, foram preparadas soluções em diferentes concentrações, sendo então determinadas as tensões superficiais. Com estes dados, construiu-se um gráfico da tensão superficial por concentração, onde através da interpolação das retas, obteve-se a concentração micelar crítica, como pode ser observado na Figura 2.

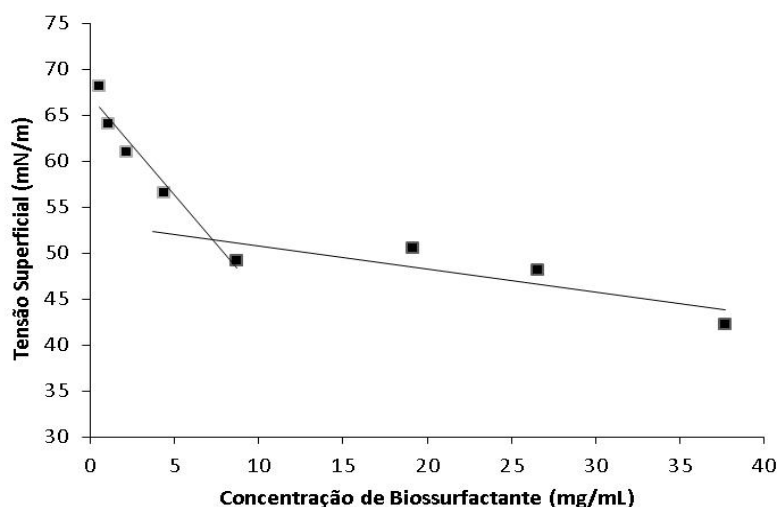


Figura 2 - Variação da tensão superficial em função da concentração do biossurfactante produzido pelo fungo UEA_115.

O valor de CMC encontrado foi de 7,287 mg/mL, um valor alto, quando comparado a outros biossurfactantes reportados na literatura. Entretanto, vale ressaltar que o resultado de CMC aqui obtido foi calculado para a amostra bruta do biossurfactante extraído do meio de cultivo fúngico, sem nenhuma etapa de purificação.

Zhang e Miler (1992) e Monteiro (2007) relataram que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a CMC está tipicamente entre 1 e 2000 mg/L (0,001 e 2 mg/mL) para biossurfactantes purificados.

Embora o biossurfactante obtido no presente trabalho apresente CMC acima do que é considerado ideal, por outro lado, o valor de índice de emulsificação foi bom, quando comparado com o SDS, um dos surfactantes químicos mais utilizados nas maiorias das indústrias que possui CMC de 2,365 mg/mL (Mukherjee e Mysels, 1971).

4. CONCLUSÕES

Comprovou-se a produção de biossurfactante a partir dos fungos degradadores de madeira isolados da Região Amazônica. As moléculas tensoativas produzidas pelo isolado UEA_115 foram caracterizadas físico-quimicamente e mostraram um bom potencial para uso industrial. Deve-se ainda caracterizar quimicamente as moléculas obtidas, e verificar as melhores condições de cultivo para maximização da produção dos tensoativos fúngicos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à EST/UEA pela infraestrutura, à CAPES e à FAPEAM pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. M. S. **Estudo de vias biotecnológicas aplicadas à tecnologia de petróleo**. Monografia (Conclusão do Curso de Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2002.
- BECHER, P. **Emulsions: theory and practice**. v. 2. New York: Reinhold Publishing, 1965.
- BOGNOLO, G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 152, p. 41-52, 1999.
- CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p. 292-295, 2009.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K.; Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**. v. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.
- HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* from waste frying oils. **J. Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.
- HUNTER, R. J. **Introduction to Modern Colloid Science**. New York: Oxford University Press, 1992.
- JACOBUCCI, D. F. C. Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- JÖNSSON, B.; LINDMAN, B.; HOLMBERG, K.; KRONBERG, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. 2 a ed. West Sussex: Wiley, 2003.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4603-4608, 2008.
- KANNAHI, M.; SHERLEY, M. Biosurfactant production by *Pseudomonas putida* and *Aspergillus niger* from oil contaminated site. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. Sci.**, v. 3 n. 4, p. 37-42, 2012.
- KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S.; O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**, n. 31, p. 249-253, 2000
- KUMAR, M.; LEON, V.; MATERANO, A. D. S.; ILZINS, O. A.; LUIS, L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and hermotolerant *Pseudomonas* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 1047-1057, 2008.
- LIN, S. C. Biosurfactans: Recent advances – review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 66, p. 109-120, 1996.
- MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and diversity in bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 52, p. 101-121, 2003.
- MONTEIRO, A.; BONFIM, M.; DOMINGUES, V.; CORRÊA JR., A.; SIQUEIRA, E.; ZANI, C.; SANTOS, V. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5186-5193, 2010.
- MONTEIRO, S. A.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J. M. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by

- Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ. Pollut.**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p 509-515, 2006.
- MUKHERJEE, S.; MYSELS, K, J. Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems (NSRDS-NBS 36). Washington: **US Government Printing Office**, 1971.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O., WONGPANIT, P., CHAVADEJ, S., ABE, M., RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated soil. **Bioresource Technology**., v. 99, p. 1589-1595, 2008.
- REISER, J. KOCH, A. K.; JENNY, K.; KÄPPELI, O. Structure, properties and production of biosurfactants. In: OBRINGER, J. W.; TILLINGHAST, H. S. (Eds.). **Biotechnology for Aerospace Applications**, Advances in Applied Biotechnology Series, v. 3. Gulf Publishing, 1989, p. 85-97.
- ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra**, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n.1-2, p. 73-85, 2006.
- SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**., v. 27, n. 2, p. 110-116, 1987.
- SILVA, M. E. T. Bioprospecção de moléculas tensoativas em fungos endofíticos de *Piper hispidum* e *Myrcia guianensis*. **Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia**, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2015.
- SILVA, N. R. A.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; FRANCO, L. O.; SILVA, G. K. B.; SOUZA, P. M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE; C. D. C.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS TAKAKI, G. M. Biosurfactant and bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n.9, p. 15377-15395, 2014.
- ÚBEDA, B. T. **Estudo da produção de biosurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila***. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas/SP 2004, 99f.
- ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3276-3282, 1992.