

## **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR BACILLUS SUBTILIS UFPEDA 86 UTILIZANDO CASCAS DE MAMÃO COMO SUBSTRATO**

Camylla Carneiro Soares<sup>1\*</sup>; Janice Izabel Druzian<sup>1\*\*</sup>; Ana Katerine de Carvalho Lima  
Lobato<sup>1,2\*\*\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Salvador, Departamento de Engenharia Química

\*s.camylla@yahoo.com.br; \*\*janicedruzian@hotmail.com; \*\*\*katycarvalho@hotmail.com

**Resumo:** biossurfactantes são compostos tensoativos derivados de microrganismos que oferecem diversas vantagens sobre os surfactantes sintéticos, tais como baixa toxicidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica, o que possibilita seu uso em atividades como biorremediação e na recuperação avançada de petróleo. Embora o interesse em biossurfactantes esteja aumentando, esses bioprodutos não competem economicamente com os surfactantes sintéticos devido aos custos globais do processo. Desta forma, o uso de matérias-primas de baixo valor torna-se uma interessante abordagem para reduzir tais custos, uma vez que o substrato pode representar até 30% da despesa total. Neste estudo, as cascas de mamão foram utilizadas como substrato alternativo de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UFPEDA 86. A fermentação submersa foi realizada em incubadora orbital a 37 °C, 200 rpm por 96 h. Analisou-se a concentração celular, a tensão superficial e o índice de emulsificação ao longo do tempo. A cepa se adaptou bem ao substrato estudado obtendo concentração celular máxima de 1,14 g L<sup>-1</sup> em 24 h, redução da tensão superficial de 32,5% e índice de emulsificação de cerca de 66%. O resíduo de mamão mostrou ser um substrato eficaz na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*.

**Palavras-chave:** *Bacillus subtilis*, biossurfactante, resíduos, meio ambiente.

### **INTRODUÇÃO**

Surfactantes ou tensoativos são moléculas anfipáticas constituídas por uma porção apolar e uma porção polar que se acumulam na interface entre fases imiscíveis, reduzindo as tensões superficial e interfacial. Essa característica permite tornar miscível duas fases imiscíveis e possibilita a estes compostos uma ampla gama de aplicações que envolvem detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade de molhabilidade, solubilização e dispersão de fases (GHOJAVAND *et al.*, 2008).

A maioria dos surfactantes produzidos são quimicamente derivados do petróleo. No entanto, em virtude da crescente preocupação ambiental, tem-se buscado por produtos mais brandos, biodegradáveis, com baixa ou nenhuma toxicidade e que possam ser produzidos através de recursos renováveis. Esses compostos naturais derivados de microrganismos são chamados de biossurfactantes e oferecem várias vantagens sobre os surfactantes químicos, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica (GHOJAVAND *et al.*, 2008). Essas características tensoativas e pró-

(83) 3322.3222

contato@conepetro.com.br

**www.conepetro.com.br**

ambientais dos biossurfactantes permitem que eles sejam aplicados, por exemplo, na biorremediação (em caso de derramamento acidental de óleo no meio ambiente) e na recuperação avançada do petróleo (MEOR), pois reduzem a tensão interfacial e as forças capilares entre óleo/rocha, possibilitando o deslocamento do óleo através dos poros da rocha (BANAT *et al.*, 2000).

Os biossurfactantes apresentam uma grande variedade de estruturas químicas, incluindo glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios, ácidos graxos ou lipídios neutros, entre outros. As espécies de *Bacillus* produzem um amplo espectro de biossurfactantes lipopeptídicos, que são moléculas cíclicas constituídas de um ácido graxo de comprimento variável ligado a uma pequena cadeia peptídica de sete ou dez aminoácidos. Dentre os biossurfactantes lipopeptídicos, a surfactina produzida por cepas de *Bacillus subtilis* é um dos mais potentes já caracterizados (EHRHARDT, 2015).

Apesar dos biossurfactantes possuírem diversos atrativos comerciais e claras vantagens sobre os surfactantes sintéticos, a sua produção chega a custar de 3 a 10 vezes mais. Assim, a substituição dos surfactantes sintéticos por biossurfactantes vai depender do desenvolvimento de processos mais baratos que viabilizem sua produção e recuperação em larga escala. Dentre as estratégias básicas adotadas para tornar esse processo mais competitivo destaca-se a utilização de fontes renováveis e de baixo custo como matéria-prima para constituir os meios de fermentação, uma vez que estas representam em torno de 10 a 30% do custo total do processo. A utilização de resíduos na produção de biossurfactante tem sido impulsionada pois, além da questão ambiental envolvida na destinação dos mesmos, há ainda a grande carga nutricional desta matéria-prima que não seria aproveitada e também a sua valorização econômica, uma vez que muitos são simplesmente descartados (BANAT *et al.*, 2000; EHRHARDT, 2015).

Cascas de mamão, por exemplo, fornecem uma boa alternativa de substrato para a fermentação, uma vez que possuem um bom equilíbrio nutricional e são normalmente descartadas nas indústrias de processamento de frutas (GONDIM *et al.*, 2005). Segundo Gondim *et al.* (2005), o principal macronutriente presente nos resíduos do mamão é o carboidrato, o que faz deste resíduo uma excelente fonte de energia e um bom substrato para a fermentação. Segundo dados fornecidos pelo controle de qualidade da empresa Brasfrut® (Feira de Santana, BA), cerca de 65 toneladas de resíduos de mamão foram descartadas por essa empresa em 2016.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da produção de biossurfactante por uma cepa de *Bacillus subtilis* utilizando cascas de mamão como substrato alternativo de baixo custo. A produção foi realizada durante 96 h onde se analisou o crescimento celular, a redução da tensão superficial e o índice de emulsificação.

## **METODOLOGIA**

### **Microrganismo**

A cepa de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 utilizada neste estudo foi cedida pela Universidade Federal de Pernambuco. A cultura foi mantida em tubos contendo 10,0 g L<sup>-1</sup> de triptona; 5,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 5,0 g L<sup>-1</sup> de NaCl e 20,0 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 6,8 utilizando NaOH 1M ou HCl 1M. A inoculação foi realizada em capela de fluxo laminar e os tubos foram incubados a 37 °C por 24 h e armazenados a 4 °C.

### **Pré-inóculo e inóculo**

Os caldos utilizados como pré-inóculo e inóculo apresentaram a mesma composição: 20,0 g L<sup>-1</sup> de glicose; 3,0 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,0 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,0 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e pH corrigido para 6,8 utilizando NaOH 1M ou HCl 1M. Em seguida realizou-se a esterilização a 121 °C e 1 atm por 15 min.

O pré-inóculo foi preparado através da transferência de três alçadas da cultura para um Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio e depois levado a uma incubadora com agitação orbital a 37 °C e 200 rpm durante 6 h. Para o inóculo, utilizou-se um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Nesta etapa, retirou-se do pré-inóculo uma alíquota correspondente a 10% (v/v) do inóculo, transferiu-se para o Erlenmeyer e incubou-se sob agitação orbital a 37 °C e 200 rpm por cerca de 16 h.

### **Preparo do substrato**

As cascas utilizadas foram cedidas pela Brasfrut®, empresa brasileira de processamento de frutas situada em Feira de Santana, Bahia. Para o preparo do meio, homogeneizou-se as cascas de mamão com água destilada em liquidificador doméstico na concentração de 250 g L<sup>-1</sup>, conforme proposto por Souza *et al.* (2012). Em seguida, filtrou-se e centrifugou-se a 10000 rpm e 25 °C durante 10 min até a remoção de toda a parte sólida e obtenção do extrato aquoso (caldo) que foi utilizado como substrato para

fermentação. Corrigiu-se o pH para 6,8 com NaOH 1M. Para a fermentação, utilizou-se volumes de 50 mL do meio de cultivo em Erlenmeyers de 250 mL.

### **Produção de biossurfactante**

A produção foi realizada através de fermentação submersa em incubadora orbital (*shaker*) a 37 °C e 200 rpm durante 96 h. Amostras foram coletadas em intervalos regulares para monitorar a concentração de biomassa, a concentração de substrato, a concentração de produto, a variação da tensão superficial e o índice de emulsificação. As amostras coletadas eram centrifugadas a 10000 rpm e 25 °C por 10 min a fim de separar o corpo de fundo (biomassa) do sobrenadante (caldo fermentado isento de células) contendo o biossurfactante.

### **Determinação da concentração celular**

A concentração de biomassa foi determinada pelo método da massa seca, conforme proposto por Tríboli (1989). Neste método, o corpo de fundo foi lavado com água destilada e centrifugado 3 vezes para remoção de resíduos do sobrenadante. Após a lavagem, as amostras foram colocadas para secar em estufa a 65 °C durante 24 h até obter peso constante. Decorrido este período, os tubos foram colocados em dessecador por 5 minutos e em seguida pesados. A concentração de biomassa,  $X$  (g.L<sup>-1</sup>), foi expressa de acordo com a Equação 1.

$$X = \frac{m_{seca} - m_{tubo}}{50} \times 1000 \quad (1)$$

### **Determinação da tensão superficial**

A tensão superficial do caldo fermentado isento de células foi monitorada em 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 h pelo método do anel Du Noüy utilizando tensiômetro à temperatura de ± 25 °C (KUYUKINA *et al.*, 2001).

### **Determinação do índice de emulsificação**

Misturou-se os caldos fermentados isentos de células a compostos hidrofóbicos – óleo de soja, gasolina e diesel – em tubos de ensaio na proporção de 4:6, respectivamente, e homogeneizou-se em vórtex a velocidade máxima durante 1 minuto. Os tubos foram então deixados em repouso à temperatura ambiente por 24 h e no final do tempo foram feitas medições da altura da camada emulsionada ( $H_E$ ) e altura total ( $H_T$ ) dos líquidos no tubo utilizando uma régua. O índice de emulsificação foi

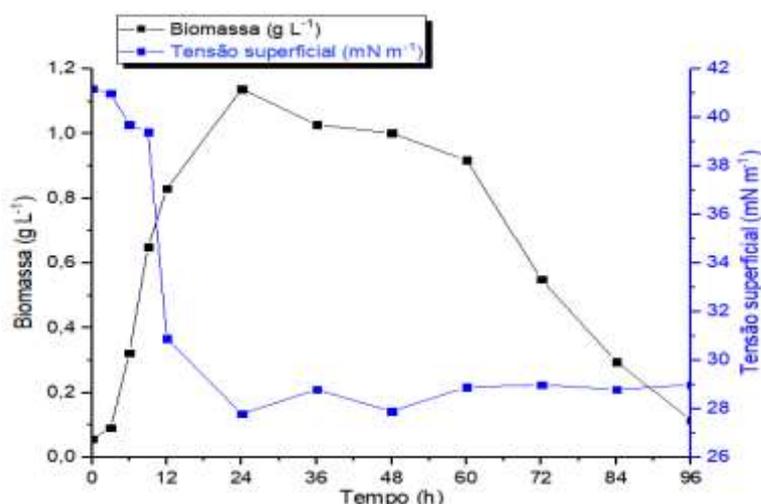
obtido pela Equação 2 descrita por Cooper e Goldenberg (1987).

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_E}{H_T} \times 100 \quad (2)$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Concentração celular e tensão superficial

A Figura 1 exibe o crescimento celular (biomassa) e o comportamento da tensão superficial ao longo de 96 h de fermentação utilizando o extrato aquoso obtido a partir das cascas de mamão como substrato.



**Figura 1.** Curvas de biomassa e tensão superficial durante 96 h de cultivo utilizando cascas de mamão como substrato.

Ao analisar a curva de biomassa, definem-se os seguintes estágios de crescimento microbiano: Fase de latência (fase lag) inexistente no intervalo de tempo analisado; fase exponencial (ou fase log) de 0 a 24 h; fase estacionária de 24 a 60 h e fase de declínio a partir de 60 h. A ausência da fase lag demonstrou que o microrganismo se adaptou quase instantaneamente ao meio utilizado neste trabalho, embora tenha sido cultivado em meio contendo glicose como principal fonte de carbono, o que demonstra a versatilidade deste microrganismo ao utilizar substratos mais complexos.

A concentração celular máxima ocorreu em 24 h de cultivo e foi de 1,14 g L<sup>-1</sup>. Silva *et al.* (2015)

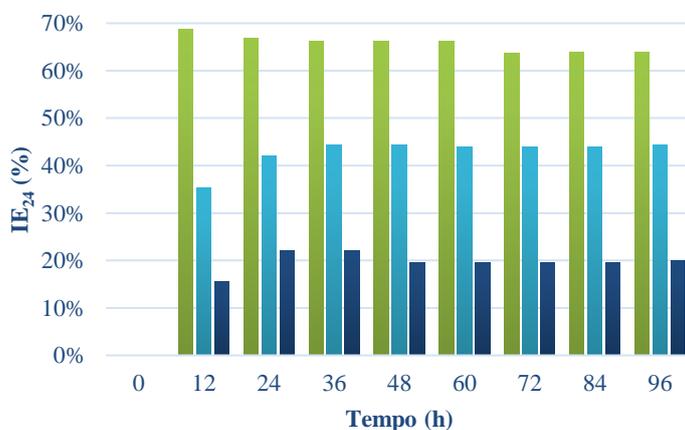
estudaram o crescimento de *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 por 48 h usando glicose e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio e obtiveram uma concentração celular máxima de  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ , valor inferior ao obtido no presente estudo, o que demonstra, mais uma vez, a boa adequação da cepa ao utilizar cascas de mamão como substrato, bem como a boa fonte nutricional que estes resíduos apresentam.

A obtenção da concentração celular bem como a medida da tensão superficial mostram, de forma indireta, a produção de biossurfactante já que durante o crescimento do microrganismo ocorre a síntese do biossurfactante que é excretado no caldo metabólico reduzindo a tensão superficial (LIMA *et al.*, 2016). Analisando o comportamento da tensão superficial observou-se uma diminuição de  $41,2$  para  $27,8 \text{ mN m}^{-1}$ , o que significa uma redução de cerca de  $32,5\%$  em 24 h de cultivo. Estes valores indicam resultados favoráveis para o substrato utilizado no presente trabalho, uma vez que a literatura indica que os biossurfactantes eficazes devem reduzir a tensão superficial do meio em pelo menos  $20\%$  (EHRHARDT, 2015).

Um estudo realizado por Ehrhardt (2015) utilizando uma linhagem de *Bacillus subtilis* e resíduos do processamento do abacaxi como substrato para síntese de biossurfactante mostrou uma diminuição na tensão superficial de  $64,54$  para  $48,25 \text{ mN m}^{-1}$  após 24 h, o que significa uma redução de cerca de  $25,2\%$ , valor inferior ao obtido neste trabalho.

### Índice de emulsificação

A Figura 2 exibe os índices de emulsificação ao longo de 96 h de fermentação utilizando as cascas de mamão como substrato. Os compostos hidrofóbicos utilizados para emulsificação foram óleo de soja, gasolina e diesel.



**Figura 2.** Índices de emulsificação dos sobrenadantes ao longo de 96 h de fermentação utilizando óleo de soja, gasolina e diesel como compostos hidrofóbicos.

Analisando os resultados da Figura 2, observou-se que o caldo fermentado foi capaz de emulsionar os três compostos hidrofóbicos testados após 12 h de fermentação, e a maior emulsificação foi observada para o óleo de soja, cujos valores foram superiores a 50% em todos os ensaios. Tanto para o óleo de soja quanto para a gasolina, os índices de emulsificação foram maiores que o encontrado por Silva *et al.* (2015), que utilizaram glicose e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio e obtiveram índice de emulsificação de 34,5% no tempo de fermentação de 24 h utilizando óleo de girassol como composto hidrofóbico. Os maiores índices de emulsificação ocorreram durante a fase exponencial de crescimento, como esperado, pois foi nessa etapa que se observou a redução mais acentuada da tensão superficial, indicando uma maior produção de biossurfactante. O maior índice de emulsificação da gasolina quando comparada ao diesel pode sugerir que o biossurfactante produzido neste trabalho emulsione melhor os hidrocarbonetos de cadeia curta, como já relatado por Barros *et al.* (2008), mas outros estudos são necessários para corroborar esta análise.

## CONCLUSÕES

A casca do mamão mostrou ser um substrato eficaz para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, uma vez que causou uma redução significativa na tensão superficial do meio. Além disso, o crescimento celular ocorreu de forma rápida, demonstrando a boa adaptabilidade do microrganismo a este substrato alternativo. Os resultados sugerem que a casca do mamão pode ser um substrato valioso para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* que é um bioproduto que poderá ser utilizado tanto para recuperação do petróleo quanto para biorremediação de áreas contaminadas, uma vez que foi capaz de emulsificar hidrocarbonetos. Além disso, a utilização desse resíduo também auxilia a redução da poluição ambiental causada por sua rejeição durante o processamento agroindustrial.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Brasfrut® pela doação dos resíduos, a Universidade Federal de Pernambuco pela doação da cepa, a Universidade Federal da Bahia pelas instalações e a CAPES pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potencial Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, p. 1071-1078, 2008.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- EHRHARDT, D. D. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato.** 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROYAEI, E.; SHAHRAKI, A. K. Production and properties of a biosurfactant obtained from member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **J. Colloid Interface Sci.**, v. 324, n. 1-2, p. 172-176, 2008.
- GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **J. Microbiol. Methods**, v. 46, n. 2, p. 149-156, 2001.
- LIMA, J. M. S.; PEREIRA, J. O.; BATISTA, I. H.; NETO, P. Q. C.; SANTO, J. C.; ARAÚJO, S. P.; PANTOJA, M. C.; MOTA, A. J.; AZEVEDO, J. L. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 15, n. 24, p. 1217-1223, 2016.
- SILVA, R. K. P.; SANTOS, S. F. M.; ALMEIDA, A. F.; DIAS, P. V. S.; COSTA, M. H. J. Avaliação do crescimento e produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*. In: I CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 6 p., Campina Grande. **Anais...** Campina Grande, 2015.
- SOUZA, O.; SCHULZ, M. A.; FISCHER, G. A. A.; WAGNER, T. M.; SELLIN, N. Energia alternativa de biomassa: bioetanol a partir da casca e da polpa de banana. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.**, v. 16, p. 915-921, 2012.
- TRÍBOLI, E. P. D. R. **Métodos analíticos para o acompanhamento da fermentação alcoólica.** 52 p. Apostila – Laboratório de Bioquímica e Engenharia de Alimentos, Escola de Engenharia de Mauá, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, 1989.