

NOVAS PERSPECTIVAS NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Isabela M.M. Vieira¹, Aline A.O.S. Prado¹, Larissa C. Ramos¹, Brenda L.P. Santos², Roberto R. de Souza³, Denise S. Ruzene³, Daniel P. Silva⁴

1. Prog. de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO/ SE
2. Estudante de IT da Universidade Federal de Sergipe – UFS
3. UFS – Departamento de Engenharia Química
4. UFS – Departamento de Engenharia de Produção / Orientador

Resumo:

O presente trabalho descreve a obtenção de biossurfactante por uso de fração hemicelulósica oriunda de sabugo de milho, glicose e nutrientes, objetivando verificar a influência da presença desses fatores no processo mediante análise estatística. Os biossurfactantes foram produzidos por bactérias que tiveram seu crescimento celular monitorado enquanto que a qualidade do produto foi verificada por meio da tensão superficial. Os resultados obtidos demonstraram que o licor obtido por pré-tratamento alcalino realizado no resíduo lignocelulósico, em pequenas proporções, foi benéfico ao processo resultando em um biossurfactante com melhor capacidade tensoativa com possibilidade de uma diminuição nos custos produtivos quando interligado a outros processos, como por exemplo dentro de um contexto de biorefinaria.

Palavras-chave: Sabugo de milho; Resíduo lignocelulósico; *Bacillus subtilis*

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Introdução:

Biossurfactantes correspondem a um grupo diversificado de moléculas possuidoras de propriedades tensoativas sintetizadas por uma variedade de microrganismos (GUDIÑA *et al.*, 2015; EL-SHESHTAWY *et al.*, 2016). São considerados uma alternativa ao uso de surfactantes sintéticos ou químicos visto que exibem uma diversidade de composições químicas e propriedades além de apresentarem vantagens quando comparados aos surfactantes químicos tais como: capacidade de reduzir tensões superficiais e interfaciais, capacidade emulsificante, natureza biodegradável, produção a partir de substratos renováveis, entre outras (GUDIÑA *et al.*, 2015; BANAT *et al.*, 2010; MUKHERJEE *et al.*, 2006).

Entretanto, há uma quantidade limitada de biossurfactantes fabricados em escala industrial devido aos altos custos de produção ocasionados pelos baixos rendimentos e a utilização de substratos custosos (MUKHERJEE *et al.*, 2006; BANAT *et al.*, 2010; GUDIÑA *et al.*, 2015). Uma das estratégias que pode ser utilizada para reduzir gastos é o uso de resíduos como substratos de menor custo para obtenção de bioprodutos, destacando o potencial dos resíduos agroindustriais ou agrícolas (MAKKAR e CAMEOTRA, 1999; BANAT *et al.*, 2010).

Resíduos advindos de atividades agrícolas são em geral denominados lignocelulosicos (PANDEY *et al.*, 2000; GALBE e ZACCHI, 2012), isto devido à estrutura complexa existente em sua composição. No entanto, pré-tratamentos são requeridos para viabilizar a extração e utilização de suas frações como fonte de carbono por microrganismos (AGBOR *et al.*, 2011).

Assim, o objetivo do presente trabalho consistiu em averiguar a viabilidade de processos inovadores de obtenção de biossurfactantes empregando para tanto sabugo de milho pré-tratado por extração alcalina com o intuito de redução de custos do processo. Para alcançar tal objetivo, foi realizada análise estatística com variações nas quantidades de frações hemicelulolíticas advindas de pré-tratamento alcalino juntamente com glicose e nutrientes de forma a verificar a influência dos fatores empregados na tensão superficial e na concentração de células do microrganismo produtor.

Metodologia:

O microrganismo produtor de biossurfactante (*Bacillus subtilis*) foi conservado em tubo inclinado com ágar nutriente a 4°C. As porções do resíduo agroindustrial (sabugo de milho) utilizado foram secas a 45°C em estufa por 24 horas, cortados em pedaços, moídos em moinho de facas, homogeneizados e estocados em temperatura ambiente.

A determinação da composição química do resíduo foi efetuada de acordo com metodologia de Gouveia *et al.* (2009) e Ruzene *et al.* (2008). A análise de hidrolisados foi efetuada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), empregando coluna Aminex HPX-87H (30x7,8 mm-Bio-RadLaboratories Ltd.) tendo como fase móvel H₂SO₄.0,005 mol.L⁻¹ em 0,6 mL.min⁻¹ a 45°C e os compostos monitorados por detector de índice de refração. O material insolúvel obtido foi retido em filtro, lavado com 1,8 L de água destilada e seco em estufa (110°C) até massa constante, sendo a lignina insolúvel calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco. A determinação da quantidade de lignina solúvel foi realizada por espectrofotometria UV-Visível e a lignina total foi obtida pela soma de lignina solúvel e insolúvel.

O pré-tratamento foi executado em amostras de 10 g de sabugo de milho tratadas com soluções de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,7 mol/L em 50°C por 120 minutos, sendo neutralizadas (pH 7,0) com solução ácida e filtradas. Este procedimento resultou em um material sólido, fração rica em um complexo de celulose-lignina, e em uma fração líquida, rica em hemicelulose (licor alcalino).

Para avaliar a influência da presença das frações hemicelulolíticas, glicose e sais, no crescimento dos microrganismos e na tensão superficial foi utilizada metodologia estatística (método do Planejamento Composto Central) com três repetições no ponto central. As variações foram de 0,4 a 1,6% na concentração de solução salina padrão, de 1 a 4% de glicose e de 8 a 32% de licor. A solução de nutrientes utilizada no processo fermentativo foi estabelecida de acordo com metodologia de Shepard e Cooper (1991), com modificações.

Para os ensaios de fermentação, um pré-inóculo foi preparado com uma alçada da cepa de *Bacillus subtilis* em Erlenmeyer contendo 10 mL de solução de peptona a 2%, incubados a 30°C, 120 rpm por 18 h. Na sequência, 10 mL deste pré-inóculo foram adicionados a uma solução de 90 mL da mistura de 1% de glicose e nutrientes, mantida em agitação a 120 rpm, 30°C por 24 horas, para obtenção do inóculo. Os ensaios com as variáveis em estudo foram realizados na sequência com 5 mL de inóculo com uma solução de 95 mL de meio fermentativo, mantida a 30°C, 120 rpm, por 72 horas.

A concentração celular foi obtida através de curva de calibração correlacionando densidade ótica (DO) com massa seca, verificadas em espectrofotômetro a 610 nm, enquanto que a tensão superficial foi medida a partir de 25 mL de cultivo livre de células por uso de tensiômetro (Attension, modelo Sigma 700) com método da placa.

Resultados e Discussão:

De acordo com metodologia utilizada, os teores de lignina solúvel e insolúvel, celulose e hemicelulose, nas amostras de sabugo de milho foram verificadas encontrando-se dentro dos padrões preconizados para este tipo de resíduo de acordo com a literatura (CRUZ *et al.*, 2000; RIVAS *et al.*, 2004). Os teores de furfural e hidroximetilfurfural, advindos da degradação de hexoses e pentoses ao longo das análises também foram determinadas, sendo obtidos valores dentro dos parâmetros estipulados na literatura (TAMANINI e HAULY, 2004).

O pré-tratamento do sabugo de milho foi realizado com o intuito de obter parte da fração hemicelulolítica do resíduo para que a mesma fosse utilizada nos ensaios para produção de biossurfactantes. Verificou-se que o pré-tratamento utilizado se apresentou eficaz no processo de remoção das hemiceluloses do sabugo de milho já que no resíduo *in natura* houve aproximadamente 25,3% de hemicelulose e após o pré-tratamento esse valor sofreu um decréscimo para 15%. De acordo com a literatura (PEREIRA FILHO *et al.*, 2002; BRIGIDA *et al.*, 2011), o método utilizado neste trabalho para remoção de hemicelulose de sabugo de milho também foi eficiente quando aplicado em outros resíduos agroindustriais para extração de frações lignocelulósicas. Quanto a composição de celulose e de lignina foi verificado uma pequena fração no licor sendo tal fato justificado pela agressividade do pré-tratamento e a existência de semelhanças ainda que mínimas entre as frações lignocelulósicas (ROUT *et al.*, 2001).

Em posse dos resultados obtidos no planejamento experimental para obtenção de biossurfactante, ao analisar duas ou mais variáveis, é do conhecimento que a análise de regressão é de extrema importância dada a possibilidade de estudar o efeito que a variação das variáveis independentes exerce no fator resposta (variável dependente). Assim, neste trabalho uma análise estatística foi realizada com o intuito de verificar a influência exercida pelas variáveis licor rico em frações hemicelulolíticas, glicose e nutrientes no crescimento dos microrganismos e na qualidade do biossurfactante obtido por meio de análises de tensão superficial.

Dentro deste contexto, o valor da probabilidade (p), determinado a partir do Teste de Fisher (Teste F), quando menor que 0,05 aponta qual variável ou interação entre variáveis é significativa para o fator resposta a 95% de confiança. Ao estimar os efeitos para o fator resposta (diminuição da tensão superficial) observou-se que o licor foi significativo ($p < 0,05$) para a diminuição da tensão superficial, assim como a glicose e a interação entre licor e glicose. Entretanto, todas as variáveis significativas apresentaram um efeito negativo ao processo. As relações entre as variáveis glicose e sais com o licor, para a resposta analisada, estão apresentadas nas superfícies de resposta (Figuras 1 e 2).

A superfície de resposta da Figura 1 representa a interação entre o licor e a glicose para variável resposta (significante à 95% de confiança), sendo possível observar que a melhor condição experimental foi na região intermediária de ambas as variáveis independentes, estabelecidas no ponto central. Verificou-se ainda uma queda do percentual de diminuição da tensão ao aumentar o teor de licor e glicose. A Figura 2 representa uma interação não significativa à 95% de confiança para o processo experimental estudado, entretanto, também mostra que a melhor condição experimental se encontra no ponto central, uma vez que a melhor região de solução salina também foi administrada neste ponto das condições.

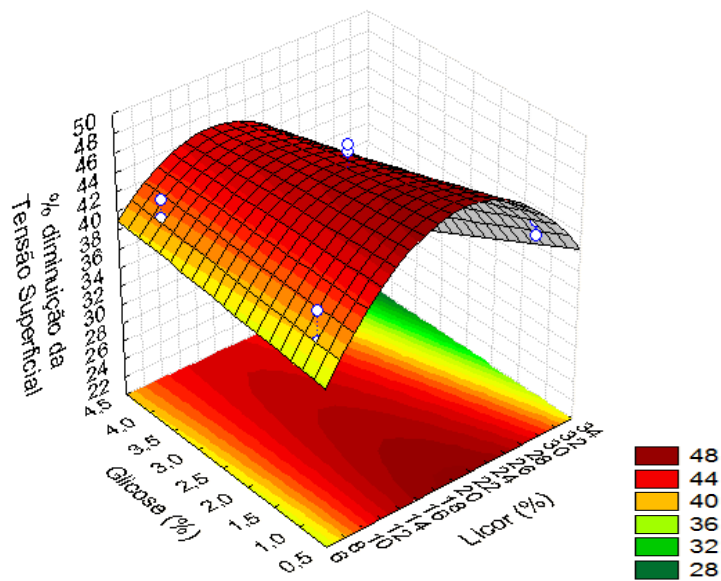


Figura 1 - Superfície de resposta dos efeitos das variáveis licor alcalino de sabugo de milho e glicose para porcentagem de diminuição da tensão superficial

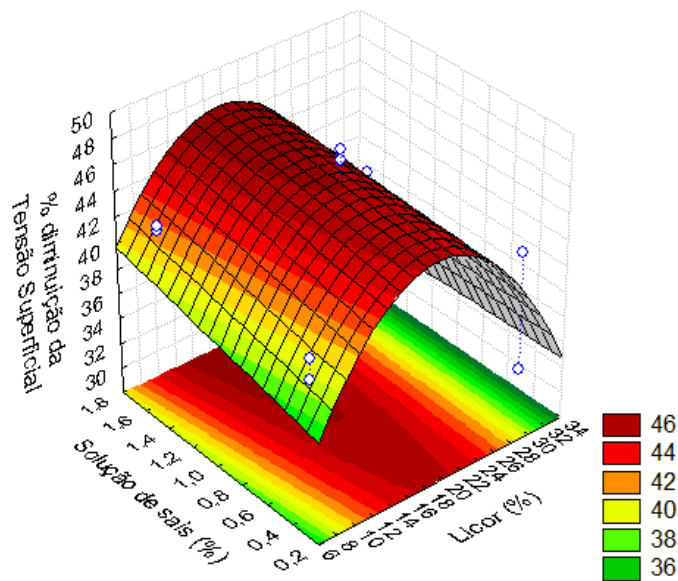


Figura 2 - Superfície de resposta dos efeitos das variáveis licor alcalino de sabugo de milho e solução de sais para porcentagem de diminuição da tensão superficial

Quando utilizou-se como fator resposta a concentração celular foi também observado que o licor possui efeito negativo significativo para o modelo proposto. Além disso, a interação entre o licor e a solução de sais também foi significativa com efeito negativo, enquanto que a glicose, a solução salina e a interação entre elas, mostraram um efeito significativo positivo à concentração de *Bacillus subtilis*, sendo verificado um efeito negativo à concentração celular ao aumentar o percentual de licor. A interação significativa entre o licor com a solução de sais indica que apenas o aumento da solução de sais interfere no aumento da concentração celular.

Conclusões:

A investigação da influência não somente da fração líquida advinda dos experimentos de pré-tratamento de sabugo de milho mas também desta fração líquida (denominada licor) aliada a glicose e sais minerais no processo de produção de biossurfactantes contribuiu para o aprimoramento do conhecimento a respeito do papel desempenhado pelos fatores citados permitindo que novas possibilidades para fabricação de biossurfactantes sejam consideradas. Os resultados obtidos por meio da análise estatística permitiram responder ao questionamento do real efeito do licor para a produção de biossurfactantes. Verificou-se que pequenas proporções de licor associado com glicose e sais permitem a produção de um biossurfactante dotado de boa capacidade tensoativa já que houve uma diminuição na tensão superficial do meio. Em um contexto de biorrefinaria, o uso de frações hemicelulolíticas oriundas do sabugo de milho tanto para a produção de biossurfactante quanto em outros processos possibilita uma redução nos custos de produção de diferentes produtos bem como a minimização do impacto ambiental gerado por resíduos produzidos por atividades industriais e/ou agrícolas. Ademais, é importante salientar o caráter inovador e original relativo a utilização de frações hemicelulolíticas oriundas de sabugo de milho em processos de obtenção de biossurfactantes visto que na literatura técnica e científica não há menções que possuam proximidade com os procedimentos descritos.

Referências bibliográficas

- AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D.B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675–685, 2011.
- BANAT, I.M; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.
- BRIGIDA A.I.S., CALADO V.M.A., GONCALVES L.R.B., COELHO M.A.Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohydrate Polymers**, vol. 79, p. 832-838, 2011.
- CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food biotechnology**, New York, v.14, p.79-97, 2000.
- EL-SHESHTAWY, H.S.; AIAD, I.; OSMAN, M.E.; ABO-ELNASR, A.A.; KOBISY, A.S. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, p. 293–298, 2016.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70-78, mai. 2012.
- GOUVEIA, E.R; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR; A.M; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, p. 1500-1503, 2009.
- GUDIÑA, E.J.; RODRIGUES, A.I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M.R.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87–93, 2015.
- MAKKAR, R.S; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, n. 2, abr. 1999.
- MUKHERJEE, S.; PALASHPRIYA, D.; RAMKRISHNA, S. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, set. 2006.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153–1169, 2000.
- PEREIRA FILHO, J. M.; VIEIRA, E. L.; SILVA, A. M. A.; CEZAR, M.F. E AMORIM, F. U. Efeito do tratamento com hidróxido de sódio sobre a fração fibrosa, digestibilidade e tanino do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*. Wild). **Revista Brasileira de Zootecnia** [online], vol.32, n.1, pp. 70-76, 2003.
- RIVAS, B.; MOLDES, A.B.; DOMINGUEZ, J.M.; PARAJO, J.C. Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 627-634, 2004.
- ROUT, J.; TRIPATHY, S. S.; NAYAK, S. K.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. Scanning Electron Microscopy Study of Chemically Modified Coir Fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, p. 1169-1177, 2001.
- RUZENE, D. S. ; SILVA, D. P. ; VICENTE, A. A. ; GONÇALVES, A. R. ; TEIXEIRA, J. A. An Alternative Application to the Portuguese Agro-Industrial Residue: Wheat Straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 147, p. 85-96, 2008.
- SHEPARD, J.D; COOPER, D.G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 72-76, 1991.
- TAMANINI, C.; HAULY, M.C.de.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, out./dez. 2004.