

PRODUÇÃO DE TENSOATIVOS BIOLÓGICOS

Acácia Pedrazza Reiche

Bolsista de Iniciação Científica, Biologia, Universidade do Rio de Janeiro

Judith Liliana. Solórzano Lemos

Orientadora, Eng^a. Química, D. Sc.

Resumo

O presente estudo visou otimizar a produção de tensoativos utilizando *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus fumigatus* e duas linhagens de *Aspergillus versicolor*, com vistas na aplicação futura na remediação de solos contaminados por petróleo. As condições empregadas foram: 100 mL de meio mineral (Silva e Tapia, 2002), adicionado de 0,4 mL de óleo de soja e mantido a 30 °C sob agitação a 150rpm, durante 7 dias. A análise da tensão superficial foi conduzida com o sobrenadante das amostras à temperatura ambiente. A linhagem que mostrou maior potencial para produção de tensoativos foi *Penicillium corylophilum* (34,9 mN/m).

1. Introdução

Os tensoativos são moléculas anfifílicas, ou seja, compostos que apresentam parte apolar (hidrófobas) e uma parte polar (hidrófila) na mesma molécula, e podem ser insolúveis e solúveis em solução aquosa. Estas moléculas agem na interface água/óleo, formando assim, micelas de formas e tamanhos diferenciados (ROCHA, 1999), ou seja, partículas da substância em estado coloidal, cercada por um conjunto de íons.

Os tensoativos são produzidos por microrganismos para aumentar a acessibilidade de substratos hidrófobos às células, facilitando o desenvolvimento da microbiota existente e, conseqüentemente, aumentando a biodegradação (ROCHA, 1999). No que tange aos solos que sofreram derramamentos de petróleo, a presença dos tensoativos se torna crucial no tratamento daqueles submetidos a um longo intemperismo, por causa do poluente estar mais aderido na sua matriz. Neste caso, o tensoativo conduziria o poluente ao seio da solução e o disponibilizaria para o ataque microbiano.

Na maioria dos casos, a adição de tensoativos sintéticos inibe a biodegradação por serem tóxicos aos microrganismos. Tensoativos produzidos biologicamente não tem efeitos danosos ao ambiente, não são tóxicos aos microrganismos, e provavelmente não irão seqüestrar irreversivelmente os hidrocarbonetos (MORÁN, 2000).

As fontes de carbono determinam o tipo e as propriedades dos tensoativos produzidos, sendo os hidrocarbonetos, os hidratos de carbono e os óleos vegetais os substratos mais usados para efeito de pesquisa. Dentre os tensoativos produzidos por bactérias, os glicolipídeos são os mais freqüentemente isolados e estudados. Entretanto, as referências quanto ao emprego de fungos como produtores de

tensoativos são escassas, merecendo, portanto, um pouco da nossa atenção. Por outro lado, comparado ao volume de trabalho feito na identificação de cepas microbiológicas em processos de fermentação, e de isolamento e caracterização das espécies, pouco tem sido feito na definição da aplicação da tecnologia de tensoativos (BOGNOLO, 1999).

2. Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo otimizar as condições de cultivo para produção de tensoativos por fungos filamentosos.

3. Materiais e Métodos

O procedimento foi dividido em três etapas: cultivo das linhagens, preparo e inoculação dos meios minerais e análise da tensão superficial.

3.1 Cultivo das linhagens

O Cultivo das linhagens foi realizado em meio Czapeck, em tubos inclinados, incubados durante sete dias a 30 °C.

3.2 Preparo e inoculação dos meios

3.2.1 Primeiro experimento

O preparo dos meios (1, 2 e 3) foi realizado utilizando a composição básica mostrada na Tabela 1, acrescidos de 0,4 % v/v de óleo de soja.

Tabela 1. Composições dos meios minerais, g/100mL, (Silva e Tapia, 2002)

Meio 1		Meio 2		Meio 3	
KH ₂ PO ₄	0,5460	KH ₂ PO ₄	0,2500	KH ₂ PO ₄	0,1000
Na ₂ HPO ₄	0,4760	NH ₄ Cl	0,4000	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,1000
NH ₄ Cl	0,2500	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0600	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1000
NaCl	0,0100	CaCl ₂	0,00100	KNO ₃	0,3000
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0800	NaCl	0,0500	NaCl	0,5000
Extr. Levedura	0,0200	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,0003	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,0200

3.2.2 Segundo experimento

O nitrogênio amoniacal dos meios 1, 2 e 3 (Tabela 1) foi substituído por uréia na concentração de 0,128 % p/v. A referência quanto à quantidade de uréia foi tomada de um experimento de biorremediação de solo contaminado por petróleo, onde a uréia apresentou um resultado favorável ao metabolismo fúngico (Santos *et al.*, 2004). Todos os meios foram adicionados de 0,4 % v/v de óleo de soja antes da incubação.

3.2.3 Terceiro experimento

Meios preparados conforme a Tabela 1 e acrescidos de NaNO_3 (0,3% p/v). No Meio 2, inclusive, foi retirado o sal de amônio, e no Meio 3 foi retirado o KNO_3 e adicionado Extrato de Levedura (EL) (0,001% p/v). Todos os meios receberam 0,4% v/v de óleo de soja como fonte de carbono.

3.2.4 Quarto experimento

No presente experimento foram avaliados três meios de cultivo (4, 5, e 6), cuja composição básica está mostrada na Tabela 2. O Meio 4 era constituído pelo meio Básico; o Meio 5 continha o Meio Básico mais 0,4 mL de óleo de soja como fonte de carbono e o Meio 6 continha o Meio Básico adicionado de 0,02 g extrato de levedura/ 100 mL (fonte de carbono), sem óleo de soja. Diferentemente dos outros meios o 4 não recebeu inicialmente a fonte de carbono (óleo de soja). O óleo foi adicionado após 7 dias de incubação, permanecendo incubado por mais 7 dias.

Tabela 2. Composição do meio mineral g/100 mL

MEIO BÁSICO	
Composto	(g)
KH_2PO_4	0,5460
Na_2HPO_4	0,4760
NH_4Cl	0,2500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0800
NaCl	0,0100

Os meios dos 4 experimentos foram transferidos para frasco de 250 mL, em duplicata, contendo cada um 100 mL de solução, sendo esterilizados a seguir. Todas as amostras foram submetidas a incubação durante 7 dias, a 30 °C e 150 rpm após a inoculação de 2 mL de suspensão de conídios, obtidos a partir dos tubos inclinados. A remoção e suspensão do inóculo foi feita em água destilada estéril. Finalizado o período de incubação procedeu-se à filtração das amostras em funil de Buchner, reservando o sobrenadante para a determinação da tensão superficial.

4. Avaliação da tensão superficial.

A análise da tensão superficial foram realizadas em Tensiômetro Krüss a 25 °C.

5. Resultados e Discussão

5.1 Primeiro experimento

De acordo com a literatura, tensões superficiais na faixa de 35 a 40 mN/m, apontam que o microrganismo é um produtor de tensoativos em potencial, e abaixo de 35 mN/m, indica que é um eficiente produtor. Dentre os 3 meios empregados, o Meio 1

favoreceu a produção de tensoativos gerados por *Penicillium corylophilum* IOC4288 (36,2 mN/m), *Aspergillus fumigatus* IOC4294 (36,5 mN/m) e *Aspergillus versicolor* IOC4266 (37,3 mN/m) (Tabela 3), mostrando-se o mais promissor dos três meios empregados inicialmente. Por outro lado, o Meio 2 não promoveu tensões inferiores a 40,5 mN/m, tomando evidente que esse meio não é adequado à produção de tensoativos, pelo menos com as quatro linhagens avaliadas. O Meio 3 favoreceu a produção de tensoativos por *A. versicolor* IOC4291 (39,8 mN/m), revelando o mesmo como um microrganismo promissor para a produção dos referidos compostos.

Tabela 3. Resultados de tensão superficial (mN/m) referentes ao meio de cultivo de Silva e Tapia, 2002

Fungos	Linhagens	Meio 1	Meio 2	Meio 3
<i>A. versicolor</i>	IOC4291	43,7	40,5	39,8
<i>A. versicolor</i>	IOC4266	37,3	41,0	42,5
<i>A. fumigatus</i>	IOC4294	36,5	50,4	51,9
<i>P. corylophilum</i>	IOC4288	36,2	44,3	42,9

5.2 Segundo Experimento

Em relação ao experimento 2 o resultado (Tabela 4) foi favorável apenas para *A. versicolor* IOC4291 que atingiu um valor de tensão superficial igual a 38,5 mN/m, sendo que, no primeiro experimento (Tabela 3), utilizando o Meio 1 foi alcançado um valor maior de tensão superficial, 43,7 mN/m. Portanto, o resultado obtido com a adição de uréia ao Meio 1 indicou um benefício na produção de tensoativos por *A. versicolor* IOC4291.

Tabela 4. Resultados referentes às tensões superficiais (mN/m) dos meios de cultivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio

Fungos	Linhagens	Meio 1	Meio 2	Meio 3
<i>A. versicolor</i>	IOC4291	38,5	47,8	48,3
<i>A. versicolor</i>	IOC4266	43,7	45,8	41,9
<i>A. fumigatus</i>	IOC4294	45,5	41,3	55,5
<i>P. corylophilum</i>	IOC4288	54,7	47,3	56,6

5.3 Terceiro experimento

Quanto ao experimento 3 o resultado (Tabela 5) obtido não era o esperado, pois todas as linhagens sofreram um aumento significativo no valor da tensão superficial em relação aos resultados dos dois experimentos anteriores. Unicamente *A. versicolor* IOC 4266 (39,7 mN/m), cultivado no Meio 1, ficou dentro da faixa esperada. No entanto, a sua produção de tensoativo foi desfavorecida no presente meio se comparada ao resultado obtido na Tabela 3, que foi de 37,3 mN/m.

5.4 Quarto Experimento

Este experimento foi realizado empregando como agente de produção *P. corylophilum*, cultivado em três diferentes meios, cuja composição básica encontram-se especificadas na Tabela 2. A decisão de utilizar *P. corylophilum* nesta etapa da pesquisa foi devido a acreditar no potencial do microrganismo, pois foi o que melhor resultado forneceu dentre as linhagens estudadas. A

escolha do meio básico (Tabela 2) se deu pelo mesmo motivo, ou seja, por ter favorecido a produção dos tensoativos de um modo geral.

Tabela 5. Resultados referentes às tensões superficiais (mN/m) dos meios de cultivo contendo nitrato de sódio (M1, 2 e 3) e EL (M3)

Fungos	Linhagens	Meio 1	Meio 2	Meio 3
<i>A. versicolor</i>	IOC4291	43,6	55,6	41,8
<i>A. versicolor</i>	IOC4266	39,7	58,6	56,1
<i>A. fumigatus</i>	IOC4294	57,3	60,6	44,7
<i>P. corylophilum</i>	IOC4288	56,3	59,1	54,9

Na Tabela 6 pode-se verificar, através dos resultados, que a estratégia de adição tardia da fonte de carbono realmente favoreceu a produção de tensoativos por *P. corylophilum*, conduzindo a um valor de 34,9 mN/m, resultado da média aritmética de 4 leituras de tensão superficial. Provavelmente, o estresse ao que foram submetidas as células microbianas tenha forçado a produção de tensoativo quando da adição da fonte de carbono 7 dias depois da inoculação do fungo. Por outro lado, percebe-se que o óleo de soja foi determinante no favorecimento da produção de tensoativos se comparamos os resultados dos Meios 6, (54,3 mN/m, sem óleo de soja) e 4 (34,9 mN/m). No entanto, ao analisar o resultado obtido com o Meio 5 (49,1 mN/m) podemos inferir que a ausência de EL promoveu um efeito desfavorável à consecução do objetivo, principalmente se o comparamos com o resultado extraído da Tabela 3 (36,2 mN/m), onde *P. corylophilum* foi cultivado em meio semelhante ao Meio 5, porém adicionado de EL.

Tabela 6. Resultados referentes às tensões superficiais (mN/m) dos meios de cultivo 4, 5 e 6

MEIO	(mN/m)
4	34,9
5	49,1
6	54,3

5. Conclusão

As linhagens que mostraram maior potencial na produção de tensoativos biológicos foram, no experimento 1: *Penicillium corylophilum* IOC4288 (36,2 mN/m), M1; *Aspergillus fumigatus* IOC4294 (36,5 mN/m), M1 e *Aspergillus versicolor* IOC4291 (37,3 mN/m), M1; experimento 2: *A. versicolor* IOC4291 (38,5 mN/m), M 2; experimento 4: *P. corylophilum* IOC4288 (34,9 mN/m), M4, podendo ser este microorganismo considerado um produtor de tensoativos. Dentre os meios, a composição básica do Meio 1 foi seguramente a mais favorável.

6. Agradecimentos

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq – pela bolsa concedida e a todos do Centro de Tecnologia Mineral - CETEM – que cooperaram na execução deste trabalho.

7. Referências Bibliográficas

MORÁN, A.C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J.L. & SIÑERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **Biodegradation** **11: 65**, v. 71, 2000.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as Emulsifying Agents for Hydrocarbons. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, p.41-52. 1999

ROCHA, J.M.S. Aplicações de agentes tensoativos em Biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, v. 64, 1999.

DA SILVA, W. O.; TAPIA, Y.I. P. **Produção de Biosurfactantes**. 2002. 63p. Projeto (Graduação) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil).

SANTOS, R.L.C.; RIZZO, A.; LEMOS, J.L.S.; MILLIOLI, V.; VALDMAN, E. & LEITE, S.G.F. Emprego de biorreatores não convencionais no tratamento de solos contaminados por petróleo – escala piloto. Relatório Interno do Projeto CETEM 601589 elaborado para o CENPES/Petrobras (Confidencial).