

## ESTUDO DA ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM SUCO DE CAJU

Rocha, M. V. P.<sup>1</sup>; Mendes, J. S.<sup>1</sup>; Giro M. E. A.<sup>1</sup>; Gonçalves, L. R. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Ceará – Depto. de Engenharia Química - Campus do Pici, Bloco 709 – 60.455-760, Fortaleza – CE. E-mail: valponterocha@yahoo.com.br; jsousamendes@yahoo.com.br; estelagiro@gmail.com; lrg@ufc.br

Neste trabalho, estudou-se a produção de biossurfactantes através do cultivo de cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju e avaliou-se a estabilidade do biossurfactante produzido frente a altas concentrações de NaCl (0 a 20 % m/v), variação de pH (3 a 12) e tempo de exposição a altas temperaturas. Os ensaios de produção do biossurfactante foram conduzidos em mesa agitadora a 30°C e 150 rpm, utilizando suco de caju como meio de cultivo suplementado com peptona. O biossurfactante produzido reduziu a tensão superficial do meio de cultura de  $50,00 \pm 0,8$  para  $29,50 \pm 0,5$  dina.cm<sup>-1</sup> nas condições experimentais estudadas e com 24 horas de cultivo, como também, emulsificou todos os hidrocarbonetos avaliados e óleo de soja e manteve-se estável a variação de NaCl, pH e temperatura. Levando em consideração os resultados obtidos no presente trabalho e os descritos em literatura, o biossurfactante produzido é adequado para aplicações em biorremediação, uma vez que apresenta estabilidade na presença de altas concentrações de NaCl, na faixa de pH estudada e quando exposto a altas temperaturas.

**Palavras-chaves:** *Pseudomonas aeruginosa*, biossurfactantes, estabilidade, suco de caju

### 1. INTRODUÇÃO

As atividades relacionadas à indústria do petróleo envolvem grandes riscos ambientais, face à possibilidade de contaminação do ar, dos solos e das águas por uma gama de compostos orgânicos altamente poluentes. Os riscos vão desde a extração até o consumo, sendo que, os danos mais graves acontecem, geralmente, durante o transporte de combustível, devido a vazamentos de oleodutos e navios petroleiros.

Atualmente, as soluções mais freqüentemente utilizadas para resolver problemas de derramamento de óleo compreendem a utilização de substâncias químicas dispersantes, coagulantes e/ou uso de redes de contenção de óleo. Contudo, essas práticas além de não serem muito eficientes, são de alto custo. Uma alternativa atraente é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos (ou de seus produtos) capazes de degradar o petróleo e/ou seus derivados. Geralmente, esses microrganismos atacam os poluentes com o auxílio de biossurfactantes por eles produzidos.

Tensoativos ou surfactantes constituem uma importante classe de produtos químicos amplamente utilizados em vários setores industriais. São substâncias que possuem ação superficial, devido às suas características anfífilas (presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos numa mesma molécula). Os surfactantes de origem microbiana ou biossurfactantes são uma alternativa aos tensoativos sintéticos, apresentando inúmeras vantagens em relação a estes: biodegradabilidade, baixa toxicidade e podem atuar em condições mais drásticas de temperatura ou pH (Banat *et al.*, 2000). Segundo Santa Anna (2002), a indústria do petróleo é o maior mercado para a utilização de biossurfactantes. Estes agentes tensoativos biodegradáveis vêm sendo utilizados em sistemas de controle de poluição do meio ambiente em derramamentos de petróleo e seus derivados, visto que aumentam a biodisponibilidade dos contaminantes (Desai e Banat, 1997). Além desta aplicação, podem ser utilizados como meio para aumentar a produção de poços de petróleo, limpeza de tanques, fabricação de películas ultrafinas, processamento químico de papel, etc. (Nitschke e Pastore, 2002). As indústrias de medicamentos, alimentos, cosméticos, detergentes para roupas, agentes processadores de minério, entre outras, também têm se beneficiado das propriedades dos agentes tensoativos.

Do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes químicos, devido principalmente ao seu alto custo (Banat *et al.*, 2000) associado a processos ineficientes de recuperação e purificação (Fox e Bala, 2000, Rocha *et al.*, 2006). Porém, o uso de substratos alternativos como, resíduos agroindustriais, pode contribuir para a redução de custos, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50 % do valor do produto final (Makkar e Cameotra,

1999). O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos envolve a seleção de um substrato que contenha um balanço correto de nutrientes que suportem tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse (Nitschke e Pastore, 2006). Outras dificuldades importantes são: a padronização e os custos com transportes, armazenagem e tratamento prévio.

Neste contexto, este trabalho propõe o estudo de um processo fermentativo que permita a obtenção de biossurfactantes utilizando como substrato alternativo, o pedúnculo de caju, por se tratar de matéria-prima de baixo custo e abundante no estado do Ceará e avaliar sua estabilidade frente a variação de NaCl, pH e temperatura.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A poluição por petróleo e seus derivados, em ambientes marinhos, tem sido um dos principais problemas ambientais das últimas décadas. Diversas técnicas físicas e químicas foram desenvolvidas para a retirada do petróleo derramado no mar ou para a redução dos seus efeitos sobre o ecossistema, como rede de contenções. A descoberta de certas bactérias que vivem nos sedimentos marinhos, inclusive na areia das praias, e que podem degradar os componentes do petróleo, abriu a possibilidade de usar métodos biológicos para o tratamento dos derrames. Esses métodos, objeto de pesquisas recentes no Brasil, são chamados, em seu conjunto, de biorremediação (Crapez *et al.*, 2002).

Segundo Nitschke e Pastore (2002) 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 subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras.

Os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (Nitschke e Pastore, 2002). Segundo Mulligan e Gibbs (1993), a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 dina.cm<sup>-1</sup> respectivamente.

Dentre os biossurfactantes, destacam-se os ramnolipídeos, formados por uma ou duas moléculas de ramnose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β-hidroxidecanoico (Desai e Banat, 1997). Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* sp. têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial contra n-hexadecano para 1 dina.cm<sup>-1</sup> e a tensão superficial da água para 25 a 30 dina.cm<sup>-1</sup>, usando concentrações entre 10 e 200 mg.L<sup>-1</sup> (Lang e Wagner, 1987). Além de reduzirem a tensão superficial, estabilizam emulsões e são geralmente atóxicos e biodegradáveis (Banat *et al.*, 2000).

Embora o potencial de produção de ramnolipídeos seja determinado pela genética do microrganismo outros fatores, como por exemplo, condições ambientais e a natureza do substrato também influenciam no nível de expressão (Rahman *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* pode utilizar diferentes substratos como: alcanos, piruvato, glicerol, succinato, frutose, óleo de oliva, glicose e manitol para produzir ramnolipídeos (Mulligan *et al.*, 2001).

Alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em condições ambientais drásticas. Diferentes dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações em biorremediação e tratamento de resíduos (Horowitz e Currie, 1990). Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl, enquanto concentrações salina de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais (Bognolo, 1999).

Um grande número de aplicações industriais para utilização de biossurfactante tem sido investigado (Desai *et al.*, 1994). O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, no qual não requer alto grau de pureza, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Entretanto, ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros.

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Segundo Mesquita (2004), o uso de biossurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. A degradação de hexaclorociclohexano por surfactante produzido por *Pseudomonas* foi relatada, sendo que outros organoclorados e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau (Mesquita, 2004). Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo. Bognolo (1999) relatou que surfactantes produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminada.

Além das propriedades surfactantes, os ramnolipídeos podem ser utilizados com agentes de quelação e remoção de metais pesados, como cádmio e zinco (Kitamoto *et al.*, 2002; Lang e Wullbrandt,

1999; Sandri *et al.*, 1990). Também podem ser usados como fonte de L-ramnose e (R)-3-hidroxicanoato através de sua hidrólise. A L-ramnose é usada comercialmente na produção de compostos flavorizantes de alta qualidade e o (R)-3-hidroxicanoato pode ser usado como bloco de construção quiral (Lang e Wullbrandt, 1999).

Lang e Wullbrandt (1999) estimam que ramnolipídeos custam em torno de 5,00 a 20,00 dólares por quilo quando produzidos por fermentação, nas quantidades de 20 m<sup>3</sup> (US\$ 20,00/Kg) para 100 m<sup>3</sup> (US\$ 5,00/Kg). Em contraste, alquil-poliglicosídeo, custa em torno de US\$ 1-3/Kg. A utilização de substratos alternativos como, por exemplo, resíduos agroindustriais, podem contribuir para a redução do custo de produção de biossurfactantes uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 30% do valor do produto final (Makkar e Cameotra, 1999).

No Estado do Ceará, por exemplo, o problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo, como por exemplo, o pedúnculo do caju. A agroindústria do caju contribui de forma relevante para a pauta das exportações nordestinas (amêndoa, suco e LCC) e, sem dúvida, é o setor mais importante da economia regional. No entanto, apenas uma pequena parte do pedúnculo produzido é aproveitada industrialmente, em torno de 2 a 6 % (Morton, 1997; Campos *et al.*, 2002). A quantidade desperdiçada (92 a 94 %) apresenta elevado potencial, pois é matéria-prima rica em carboidratos (açúcar e amido), fibras, vitaminas e sais minerais.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Materiais e Métodos**

##### **3.1.1. Matéria-Prima**

Neste trabalho avaliou-se a produção de biossurfactantes utilizando suco de caju integral, como meio de cultivo. O suco de caju integral foi preparado a partir de cajus (*Anacardium occidentale* L.) coletados na Horta da Universidade Federal do Ceará (UFC).

##### **3.1.2. Microrganismo**

Utilizou-se a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, gentilmente cedida pela Pesquisadora Dra. Fátima Borges da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. A cepa foi mantida em ágar nutritivo (extrato de levedura 3 g.L<sup>-1</sup>, peptona 5 g.L<sup>-1</sup> e ágar 15 g.L<sup>-1</sup>, marca Biolife) em camada alta, recobertas com óleo mineral, sob refrigeração a 4°C e repicadas a cada 60 dias.

#### **3.2. Preparação e Caracterização da Matéria-Prima**

##### **3.2.1. Preparação do Suco de Caju Integral**

Após a coleta, o caju foi conduzido ao Laboratório de Bioengenharia (UFC), onde foi processado. Primeiramente, retirou-se a castanha e o pseudofruto (pedúnculo) que foi lavado com água. Após a lavagem, o suco de caju foi obtido por prensagem do pseudofruto. Com a finalidade de retirar o bagaço e outras partículas sólidas, o suco de caju foi centrifugado a 3500 rpm por 20 minutos e filtrado em papel de filtro com poros de 25 µm. Para armazenagem, o suco foi distribuído em garrafas plásticas e mantido a -10 °C, sem adição de conservantes.

##### **3.2.2. Caracterização do Suco de Caju Integral**

O suco de caju integral foi caracterizado quando a composição de nitrogênio, carbono e aminoácidos. O pH do suco foi medido utilizando um medidor de pH (marca Tecnal, modelo Tec-3MP). A concentração de proteínas totais foi determinada segundo o método de Baethgen e Alley (1989), mais conhecido como método de Kjeldahl, e proteínas solúveis pelo método de Bradford (1976). A composição de aminoácidos foi analisada no Laboratório de Análises Químicas e Bioquímicas Clementino Fraga, por cromatografia de líquida de alta eficiência. A concentração de glicose e frutose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando cromatógrafo Waters (Modelo 2414) acoplado a detector de índice de refração (célula a 40°C), coluna Shodex SC 1011 (8,0 mmID x 30 mmL) e fase móvel H<sub>2</sub>O MiliQ com vazão de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> a 80°C. Os açúcares presentes no suco foram determinados através de comparação com os tempos de retenção de soluções padrões de glicose e frutose.

### **3.3. Produção de Biossurfactantes por *P. aeruginosa* ATCC 10145 usando Suco de Caju Integral como Meio de Cultivo**

#### **3.3.1. Preparação do Inóculo**

O inóculo de *P. aeruginosa* ATCC 10145 foi preparado inserindo-se 3 alças do *slant* contendo o microrganismo em 50 mL de Caldo Nutritivo (peptona 5 g.L<sup>-1</sup> e extrato de carne 3 g.L<sup>-1</sup> da marca Biolife). A seguir, incubou-se a 150 rpm e 30°C, durante 24 h, em agitador rotatório (*shaker* Tecnal TE-480). Após este tempo, diluiu-se o inóculo com Caldo Nutritivo até obter uma densidade ótica de 0,5, medida a 600 nm. Posteriormente, retirou-se alíquotas de 1 mL (2 % v/v), que foram utilizadas para inocular os meios de cultivos utilizados na produção do biossurfactante.

#### **3.3.2. Produção de Biossurfactante**

Para a produção de biossurfactantes com *P. aeruginosa* ATCC 10145, utilizou-se suco de caju natural, diluído com água na proporção de 1:10, suplementado com peptona (CAJP) como fonte de nitrogênio, na concentração de 5 g.L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M. Posteriormente, esterilizou-se o meio por filtração utilizando membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm. A fermentação foi conduzida nas mesmas condições utilizadas para o preparo do inóculo. Em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para medidas do pH e tensão superficial do meio de cultivo e determinação da concentração de açúcares, quando presentes. Antes de analisadas, as amostras eram primeiramente filtradas em membrana com diâmetro de 0,45 µm para a remoção de células.

### **3.4. Determinação do Efeito de NaCl, Temperatura e pH na atividade do Biossurfactante**

#### **3.4.1. Estabilidade frente à Força Iônica**

Após a purificação, diluiu-se o biossurfactante em água destilada contendo uma concentração conhecida de NaCl (entre 0,5 e 20 %, m/v) e a sua atividade foi avaliada através da medida de tensão superficial (Ilori *et al.*, 2005).

#### **3.4.2. Estabilidade frente a pH**

Para determinar o efeito do pH na atividade emulsificante, variou-se o pH da solução contendo o biossurfactante purificado e dissolvido em água destilada, entre 2,0 e 12,0. Utilizou-se uma solução de NaOH ou HCl 1M para ajuste do pH no valor desejado. O efeito do pH na atividade emulsificante foi avaliado através da medida de tensão superficial (Ilori *et al.*, 2005).

#### **3.4.3. Estabilidade frente à Temperatura**

Para se avaliar o efeito da temperatura na atividade emulsificante, uma solução contendo o biossurfactante foi mantida a temperatura de 100°C por 15, 30, 60 e 75 minutos e a 121°C por 15 minutos. Após a solução atingir a temperatura ambiente, determinou-se a tensão superficial.

### **3.5. Métodos Analíticos**

#### **3.5.1. Determinação do pH do meio de cultivo**

O pH do meio de cultivo fermentado foi determinado utilizando-se um potenciômetro da marca Tecnal, modelo Tec-3MP a aproximadamente 27°C.

#### **3.5.2. Determinação da tensão superficial**

Como a presença do biossurfactante diminui a tensão superficial do meio, este parâmetro foi utilizado para acompanhar a sua produção (Lima Lobato *et al.*, 2002; Santa Anna *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2006). Para a determinação da tensão superficial (TS) utilizou-se tensiômetro Krüss K6 a temperatura de 30°C.

### 3.5.3. Determinação do Índice de Emulsificação

Este procedimento consistiu em colocar 2 mL do meio de cultura fermentado (livre de células) em tubo de ensaio, com fundo chato, adicionando o mesmo volume de hidrocarboneto ou óleo de soja. Agitou-se em vortex por um minuto, em alta rotação (Cooper e Goldenberg, 1987). Após 24 horas calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total (Equação 1). O teste do índice de emulsificação foi realizado em triplicata.

$$E_{24}(\%) = \frac{H_{EL}}{H_S} * 100 \quad (1)$$

sendo  $H_{EL}$  a altura da região emulsificada e  $H_S$  a altura total da solução.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Caracterização do Suco de Caju

A composição físico-química do pedúnculo do caju varia largamente em função, da variedade, estado de maturação, tamanho, duração da colheita e variações ambientais regionais (Damasceno e Bezerra, 2002). Desta forma, neste trabalho, padronizou-se e caracterizou-se todo o suco utilizado, de forma a obter resultados consistentes. Além disso, os microrganismos têm necessidades nutricionais que precisam ser satisfeitas pelo meio de cultivo utilizado. Portanto, esta caracterização indicou também se havia necessidade de suplementação do suco com nutrientes essenciais. A Tabela 1 apresenta os principais parâmetros avaliados para o suco de caju integral.

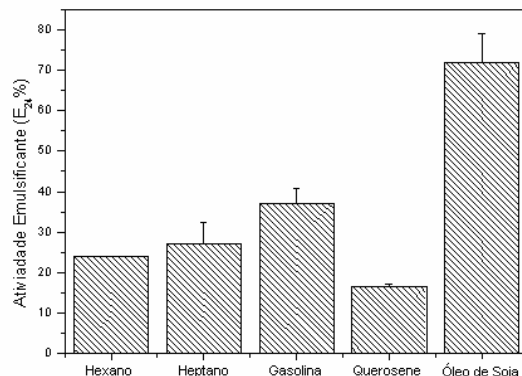
**Tabela 1:** Composição do suco de caju integral.

Parâmetro	Concentração
Concentração de glicose (g.L <sup>-1</sup> )	55,99 ± 1,3
Concentração de frutose (g.L <sup>-1</sup> )	47,89 ± 0,1
Proteínas solúveis (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,73 ± 0,0
Proteínas Totais (mg.mL <sup>-1</sup> )	3,61 ± 0,2
Ácido aspártico (µg.mL <sup>-1</sup> )	128,94
Ácido glutâmico (µmol mL <sup>-1</sup> )	181,45
Serina (µmol mL <sup>-1</sup> )	172,42
Glicina (µmol mL <sup>-1</sup> )	224,34
Histidina (µmol mL <sup>-1</sup> )	33,10
Treonina (µmol mL <sup>-1</sup> )	371,47
Alanina (µmol mL <sup>-1</sup> )	284,75
Prolina (µmol mL <sup>-1</sup> )	152,13
Tirosina (µmol mL <sup>-1</sup> )	81,76
Valina (µmol mL <sup>-1</sup> )	27,94
Metionina (µmol mL <sup>-1</sup> )	7,38
Cisteína (µmol mL <sup>-1</sup> )	9,74
Isoleucina (µmol mL <sup>-1</sup> )	39,00
Leucina (µmol mL <sup>-1</sup> )	99,44
Fenilalanina (µmol mL <sup>-1</sup> )	12,86
Lisina (µmol mL <sup>-1</sup> )	13,09
pH = 4,47 ± 0,1	

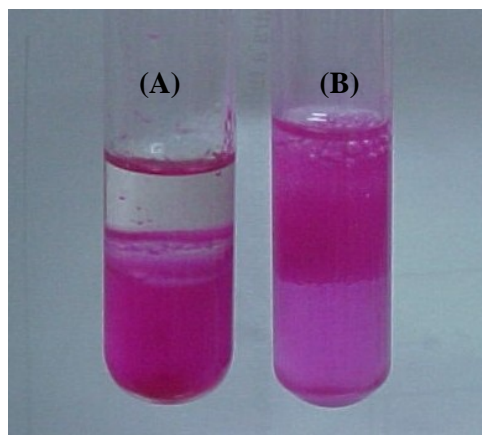
### 4.2. Caracterização do Biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

Com a finalidade de investigar possíveis aplicações do biossurfactante obtido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em CAJP, procederam-se estudos de atividade emulsificante. Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersada como gotas microscópicas em uma outra fase contínua líquida, sendo que as duas fases, são imiscíveis entre si (Desai e Banat, 1997). Para avaliar a capacidade de formar emulsões, diversos hidrocarbonetos (hexano, heptano, gasolina e querosene) e óleo de soja foram colocados em contato com o biossurfactante, e os resultados são mostrados na Figura 1. A Figura 2

mostra uma fotografia da emulsão obtida quando se utilizou o biossurfactante e querosene. Todos os hidrocarbonetos avaliados foram emulsionados pelo biossurfactante. O maior índice de emulsificação foi obtido com óleo de soja (71,79 % de emulsificação), enquanto o menor índice foi com querosene (16,50 % de emulsificação). A maioria dos surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta (Ilori *et al.*, 2005).



**Figura 1:** Atividade Emulsificante (IE<sub>24</sub>%) do biossurfactante (produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio com suco de caju suplementado com peptona (CAJP)) frente a diferentes hidrocarbonetos e óleo de soja. Barras de erros representam o desvio padrão.

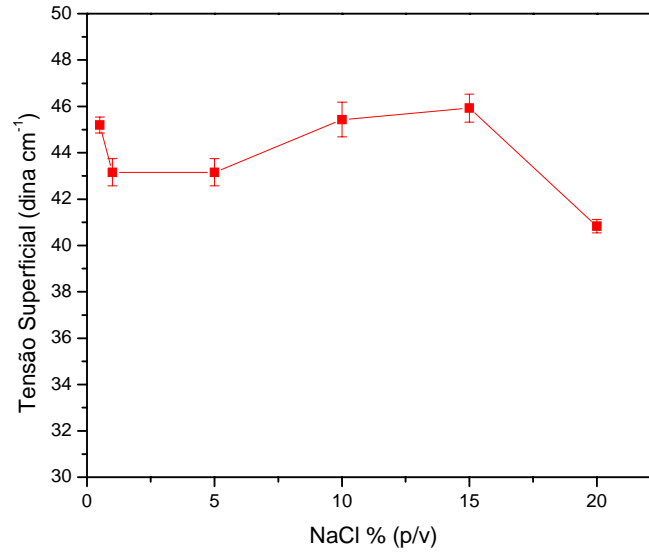


**Figura 2:** Emulsificação do querosene pelo biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 em suco de caju suplementado com peptona (CAJNP): (A) 0 hora de cultivo e (B) 24 horas de cultivo.

#### 4.2. Estudo da Estabilidade do Biossurfactante produzido por fermentação de CAJP por *P. aeruginosa* ATCC 10145 frente a variações de pH, Temperatura e Concentração de NaCl

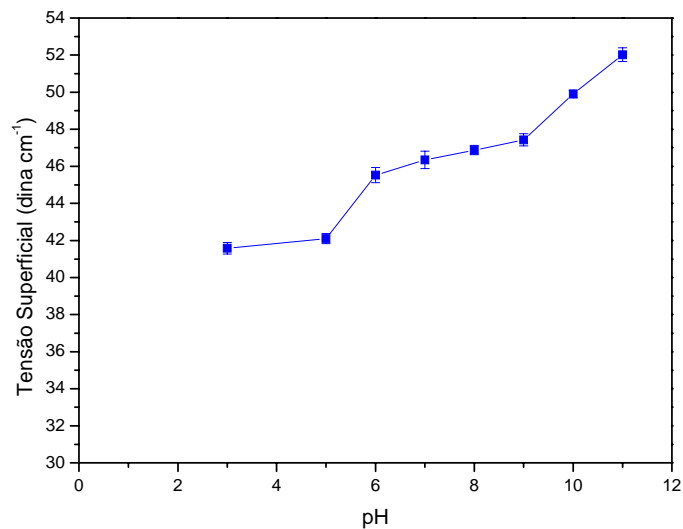
Fatores ambientais como salinidade, pH e temperatura afetam a atividade do biossurfactante (Ilori *et al.*, 2005). Portanto, estudou-se a estabilidade do biossurfactante produzido neste trabalho usando CAJP como meio de cultivo por *P. aeruginosa* ATCC 10145. As Figuras 3 a 5 apresentam a estabilidade do biossurfactante frente a variações na concentração de NaCl, modificação de pH e diferentes tempos de exposição à temperatura de 100°C, respectivamente.

Observou-se, na Figura 3, que não houve um aumento expressivo na tensão superficial, da solução contendo o biossurfactante, quando exposto as diferentes concentrações de cloreto de sódio, variando de 0 a 20 % (m/v). Uma análise estatística, realizada utilizando o software Origin versão 6.0, mostrou que não houve diferença significativa, com 95 % de confiança, entre os valores de tensão superficial nas diferentes concentrações de NaCl utilizadas. Este resultado é interessante quando se considera o uso do biossurfactante na bioremediação em ambientes salinos, como por exemplo, na recuperação de derramamentos de petróleo em ambientes marinhos. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de NaCl enquanto que concentrações salina de 2 a 3 % são suficientes para inativar surfactantes convencionais (Nitschke e Pastore, 2002).

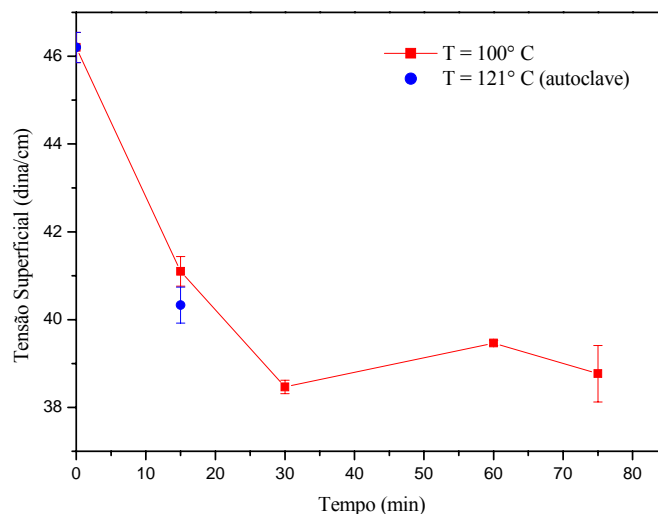


**Figura 3:** Efeito da concentração de NaCl na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJP a 30°C e 150 rpm.

Na Figura 4 verificou-se uma diminuição na atividade tensoativa na faixa de pH de 6 a 9. Na escala de pH de 3 a 5, a atividade tensoativa se manteve praticamente constante. Porém, uma análise estatística, realizada utilizando o software Origin versão 6.0, mostrou que não há diferença significativa, com 95 % de confiança, entre os valores de tensão superficial nos diferentes valores de pH estudados.



**Figura 4:** Efeito da variação do pH na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJP a 30°C e 150 rpm.



**Figura 5:** Efeito do tempo de exposição à temperatura de 100°C na atividade do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* ATCC 10145 no meio CAJNP a 30°C e 150 rpm.

Com relação aos resultados obtidos quanto ao efeito do tratamento térmico na atividade do biossurfactante (Figura 5), pode-se observar que a tensão superficial diminuiu após exposição a altas temperaturas (100°C), por 75 minutos, ou quando submetida à esterilização em autoclave (121°C por 15 min). No entanto, através da análise estatística realizada (software Origin 6.0), observou-se que não há diferença significativa, com 95 % de confiança, entre os valores de tensão superficial ao longo do tempo de exposição a 100°C ou por 15 min a 121°C.

Biossurfactantes que apresentam elevada estabilidade frente à temperatura e pH podem ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por 140 h e pH entre 5 e 12 (Horowitz *et al.*, 1990). Ilori *et al.* (2005) avaliou a estabilidade do biossurfactante produzido por *Aeromonas ssp.*, e verificou que este apresentava melhor atividade surfactante na concentração de 5 % (m/v) de NaCl, pH de 8,0 e temperatura de 40°C, e permaneceu com 77 % de sua atividade após exposição por 120 min a 100°C. Levando em consideração os relatos de literatura, e as características apresentadas pelo biossurfactante produzido no presente trabalho, pode-se dizer que o mesmo é adequado para aplicação em biorremediação, como por exemplo, em derramamento de petróleo e seus derivados em mares ou solos, uma vez que é estável na presença de altas concentrações de NaCl, na faixa de pH estudada e quando exposto a altas temperaturas.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, o suco de caju pode ser utilizado como substrato para o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactantes. Além disso, a exploração do suco de caju como meio de cultivo não será apenas redução no custo da produção de biossurfactante, mas também trará uma finalidade a um material que geralmente fica no chão dos locais de colheita e contribui à poluição ambiental. Os hidrocarbonetos: hexano, heptano, gasolina e querosene, e óleo de soja foram emulsionados pelo biossurfactante. O óleo de soja (71,79% de emulsificação) foi o melhor substrato, enquanto o querosene (16,5% de emulsificação) foi o pior substrato. Com base nos estudos da estabilidade do biossurfactante produzido no suco de caju suplementado, verifica-se que o produto de interesse pode ser aplicado na bioremediação, em ambientes com alta salinidade, temperatura e pH como, por exemplo, em derramamento de petróleo e seus derivados em mares ou solos.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ANP, Agência Nacional do Petróleo, ao CNPq e Funcap, pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.



## 7. REFERÊNCIAS

- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BAETHGEN W. E. E ALLEY M. M. A. Manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digestin. *Commun in Soil Sei Plant Anal.*, v. 20, n. 9 e 10, p. 961-969, 1989.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf. A.*, v. 152, p. 41-52. 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMPOS, D. C. P.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalination.*, v. 148, p. 61-65, 2002.
- COOPER, D. G., GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 224-229, 1987.
- CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: Tratamento para Derrames de Petróleo. *Ciência Hoje*, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.
- DAMASCENO JÚNIOR, J. A.; BEZERRA, F. C. Qualidade de Pedúnculo de Cajueiro-Anão Precoce Cultivado Sob Irrigação e Submetido a Diferentes Sistemas de Condução e Espaçamento. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal – SP, v. 24, n. 1, p. 258-262, 2002.
- DESAI, A. J.; PATEL, R. M.; DESAI, J. D. Advances in production of biosurfactants and their commercial applications. *J. Sci. Ind. Res.*, v. 53, p. 619-629, 1994.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. **Microbial production of surfactants and their commercial potential.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 61, p. 47-64, 1997.
- FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresour. Technol.*, v. 75, p. 235-240, 2000.
- HOROWITZ, S.; CURRIE, J. K. Novel dispersants of silicon carbide and aluminum nitride. *J. Dispersion Sci Technol.*, v. 11, p. 637-659, 1990.
- ILORI, M. O.; AMOBI, A. C.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, v. 61, p. 985-992, 2005.
- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potencial application of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 94, n. 3, p. 187-201. 2002.
- LANG, S.; WAGNER F. Structure and properties of biosurfactants, p. 21-47. *In* N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed.), **Biosurfactants and biotechnology.** Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1987.
- LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipds – biosynthesis, microbial production and application potencial. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 51, p. 22-32, 1999.
- LIMA LOBATO, A. K. C.; MACEDO, G. R.; MAGALHÃES, M. M. A.; BEZERRA, M. S.; ALMEIDA, A. F.; COSTA, A. S. S. Estudo cinético da produção de biossurfactante. **Anais in CD-Row of XIV Congresso Brasileira de Engenharia Química**, Natal, Brasil, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 237-241, 1999.

MESQUITA, A. C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes. **Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, p. 107-108, 2004.

MORTON, J. F. Cashew Apple. In: **Fruits of warm climates**, Miami, p. 239, 1997.

MULLIGAN, C. N., GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N. ed., **Marcel Decker Inc.**, New York, p. 392-371, 1993.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371, 2001.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strain of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Prog.**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation médium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World J. Microbiol Biotechnol.**, v. 22, p. 1295-1299, 2006.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, p. 370-375, 1990.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA JR. N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 459-467, 2002.

### STABILITY STUDY OF BIOSURFACTANT PRODUCED BY *Pseudomonas aeruginosa* IN CASHEW APPLE JUICE

The aim of this work was to investigate the use of natural cashew apple juice as an alternative raw material for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 and evaluate the stability of the biosurfactant produced against NaCl (0 a 20 % w/v), pH (3 a 12) and the effect of periods of exposition to high temperatures. The assays of biosurfactant production were conducted on rotary shaker at 30°C and 150 rpm, using as medium cashew apple juice supplemented with peptone (nitrogen source). A reduction in the surface tension of  $50.00 \pm 0.8$  to  $29.50 \pm 0.5$  dina.cm<sup>-1</sup> was observed in the experimental studied and 24 hours of culture. Furthermore, it emulsified all the studied hydrocarbons and soybean oil. Taking into consideration the obtained results in the present work and the ones reported in the literature, the produced biosurfactant showed potential for the applications in bioremediation once it was stable in extreme conditions such as high concentrations of NaCl, large range of pH values and when exposed to high temperatures.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactants, stability, cashew apple juice