

## **PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA MENSURAÇÃO BIOSURFACTANTES BACTERIANOS EM SOLO**

**ÂNGELA CAROLINA CAPPELLARO <sup>1\*</sup>, THAÍS STRIEDER MACHADO <sup>2</sup>,  
ANDRESSA DECESARO <sup>2</sup>, KIMBERLY VAN SCHAİK REGINATO <sup>1</sup>, LUCIANE  
MARIA COLLA <sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Acadêmica do curso de Engenharia Ambiental da Universidade de Passo Fundo; <sup>2</sup>Pós-graduanda do Programa de pós-graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Passo Fundo; <sup>3</sup>Professora do curso de Engenharia Ambiental da Universidade de Passo Fundo

\*Autor para correspondência: Ângela Carolina Cappellaro (angelzir@hotmail.com)

### **1 Introdução**

O cenário brasileiro atual, no que diz respeito às áreas contaminadas, demonstra que grande parte destas são provenientes de acidentes envolvendo compostos oleosos derivados do petróleo. Para descontaminar estes locais, pode-se optar pelas estratégias de biorremediação, sendo que os diversos fatores envolvidos na técnica para áreas degradadas vêm sendo amplamente estudados a fim de otimizar este processo (DECESARO, 2016).

Sabe-se que durante o processo de biorremediação, os microrganismos do solo utilizam o contaminante e outras fontes de nutrientes presentes para multiplicarem-se. Para utilização dos contaminantes oleosos como fontes de carbono, os microrganismos normalmente produzem *in situ* moléculas que auxiliam na solubilização destes, denominadas biossurfactantes. Os biossurfactantes são importantes na biorremediação, pois possuem capacidade emulsificante, além de redução de tensão superficial, facilitando a interação dos microrganismos com o contaminante e conseqüentemente aumentando a sua degradação.

Porém, apesar dos inúmeros estudos nesta área, há uma lacuna no que diz respeito ao entendimento dos mecanismos que regem a produção destas moléculas *in situ* durante o processo de biorremediação. Portanto, torna-se relevante o desenvolvimento de técnicas analíticas que permitam a mensuração de biossurfactantes, contribuindo para a definição das variáveis que influenciam a produção destas biomoléculas.

Os microrganismos predominantemente presentes no solo são das espécies *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.*, produtores dos biossurfactantes denominados surfactina e raminolipídio, respectivamente. Neste estudo, utilizou-se a surfactina, lipopeptídeo em que os aminoácidos

estão normalmente dispostos em uma estrutura cíclica. Devido a esta fração proteica da molécula, a surfactina pode ser quantificada através de métodos utilizados para mensuração de proteínas.

Para a quantificação de proteínas, os métodos espectrofotométricos destacam-se devido à simplicidade de execução (ZAIA et al., 1998) e também por serem mais econômicos e acessíveis quando comparado a outros métodos para mensuração de compostos, como as técnicas cromatográficas.

## 2 Objetivo

Objetivou-se padronizar uma metodologia para determinação de surfactina através de método espectrofotométrico.

## 3 Metodologia

A surfactina ( $C_{53}H_{93}N_7O_{13}$ ) utilizada para a realização dos experimentos foi produzida em laboratório através da metodologia proposta por Decesaro (2016). O meio de cultivo utilizado para a produção do biosurfactante a partir de *Bacillus methylotrophicus* foi composto por soro de leite pré-tratado, suplementado com 0,5 g de sulfato de amônio (1%), 1 mL de óleo de soja (2%) e com adição da solução de micronutrientes (0,25 mL). Após a fermentação submersa realizada durante 5 dias, foi recuperado o biocomposto, através de precipitação ácida seguida de liofilização.

A mensuração da surfactina foi realizada considerando sua fração proteica, pelas suas ligações peptídicas, a qual pode ser determinada através do método de Biureto (GORNALL et al., 1949), adaptado. A surfactina (0,05g) foi diluída em 50 mL de água destilada e 50 mL de álcool etílico 92,8%, agitando por aproximadamente 20 min em agitador magnético. Foram preparadas soluções de surfactina variando de 10 a 500 mg/L.

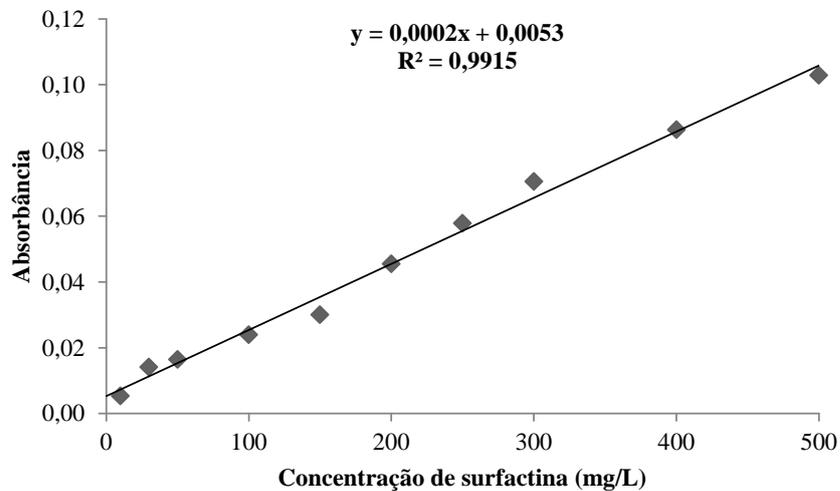
Desta solução de surfactina, foram adicionadas 2,5 mL da amostra em tubos de ensaio e em seguida 2,5 mL do reagente de Biureto, em triplicata. Após agitação, os tubos foram deixados em banho-maria a 37° por 15 min, e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A curva padrão foi estabelecida para concentrações de surfactina de 10 a 500 mg/L, e o ponto branco foi realizado com água destilada.

## 4 Resultados e discussão

A Figura 1 apresenta a curva padrão realizada para a adaptação do método de

Biureto nas concentrações entre 10 e 500 mg/L.

**Figura 1.** Curva padrão para surfactina através do método de Biureto.



A curva padrão obtida para a surfactina (Figura 1) considerou-se apropriada para aplicação na solução que será extraída do solo contendo os biossurfactantes.

A coloração do reagente de Biureto se deve as ligações estabelecidas entre o cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) e os átomos de nitrogênio livre, ambos provenientes da composição deste reagente. Da mesma forma, quando a amostra reage com o Biureto, os íons de  $\text{Cu}^{+2}$  estabelecem ligações com os peptídios, conferindo coloração à amostra (SOUZA; NEVES, 2017). Assim, o método de Biureto analisa as ligações estabelecidas entre os peptídios e as proteínas com o  $\text{Cu}^{+2}$ , sendo que quanto mais ligações peptídicas na amostra, maior será a coloração da mesma, identificadas através de espectroscopia UV/visível (ZAIA et al., 1998).

Os biossurfactantes produzidos pelos microrganismos no solo podem ser extraídos conforme Ángeles e Refugio (2013), e assim serem quantificados em meio aquoso utilizando curvas padrão.

## 5 Conclusão

O método espectrofotométrico utilizado mostrou-se capaz de identificar a surfactina presente em meio aquoso, sendo possível elaborar a curva padrão para o biocomposto. Devido a porção proteica, o método de Biureto realizou a identificação das ligações peptídicas existentes, quantificando a concentração da surfactina.

Tendo em vista que a curva padrão obtida em meio aquoso, será utilizada para

mensuração de surfactina extraído do solo, os resultados mostraram-se adequados para a utilização neste tipo de avaliação.

## Referências

ÁNGELES, M. T.; REFUGIO, R. V. In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 595-605, 2013.

DECESARO, A. **Produção de biossurfactantes a partir de resíduos da indústria de laticínios para aplicação em processos de biorremediação**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia: Infraestrutura e meio ambiente) – Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

SOUZA, K. A. F. D.; NEVES, V. A. Experimentos de bioquímica. 2017. Disponível em: <[http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas\\_proteinas/reacoes\\_coradasdois3.htm](http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/reacoes_coradasdois3.htm)>. Acesso em: 30 mar. 2017.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

**Palavras-chave:** Biossurfactante; Surfactina; Mensuração de biocomposto; Método de Biureto.

## Fonte de Financiamento

PROBIC – FAPERGS/UPF

CAPES/UPF