



Formulación de una microemulsión elaborada con keroseno y surfactantes mono-ramnolípidos

Josefina Barrera-Cortés*
ORCID: 0000-0001-9348-4275

Perla Fabiola Pacheco-Juárez*

Marlén Hernández-Hermenegildo*

<https://doi.org/10.29105/cienciauanl27.1264>

RESUMEN

Se desarrolló una microemulsión estabilizada con biosurfactantes mono-ramnolípidos producidos en reactor de tanque agitado a partir de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 (cepa no patógena). La microemulsión fue elaborada con keroseno, agua destilada, mono-ramnolípidos y etanol como cosurfactante. Estos componentes fueron integrados con agitación mecánica y ultrasonido. El diámetro de gota analizado en TEM fue de 209 nm. El índice de cremación de 27% permitió verificar la estabilidad de la microemulsión.

Palabras clave: biosurfactante, cosurfactante, microemulsión, ramnolípidos.

ABSTRACT

A microemulsion stabilized with mono-rhamnolipid biosurfactants produced in a stirred tank reactor from Pseudomonas aeruginosa ATCC9027 (non-pathogenic strain) was developed. The microemulsion was prepared with kerosene, distilled water, mono-rhamnolipids and ethanol as a cosurfactant. These components were integrated with mechanical stirring and ultrasound. The droplet diameter analyzed in TEM was 209 nm. The cremation index of 27% allowed verifying the stability of the microemulsion.

Keywords: biosurfactant, cosurfactant, microemulsion, rhamnolipids.

La contaminación del suelo con hidrocarburos es motivo de gran preocupación debido a los efectos negativos en la salud humana, la biodiversidad y los ecosistemas. Aunque los surfactantes son comúnmente utilizados para realizar la tarea de desorción de este tipo de contaminantes, presentan ciertas limitaciones cuando los hidrocarburos están fuertemente adheridos a las partículas de suelo. En este contexto, las microemulsiones podrían ser una alternativa prometedora, gracias a su mayor capacidad de penetración, estabilidad, mayor solubilidad de hidrocarburos y reducido impacto ambiental, ya que son preparadas con una menor cantidad de surfactante.

Las microemulsiones son mezclas de líquidos inmiscibles estabilizadas por un surfactante y pueden ser del tipo aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O) (Khan *et al.*, 2011). Las características de estos fluidos son de interés para el suministro de agentes activos de tipo lipofílico (McClements *et al.*, 2007). Las emulsiones se aplican en la elaboración de alimentos, bebidas, cosméticos y medicamentos, además de la desorción de contaminantes (Ashaolu, 2021). Por el diámetro de gota (Dg), son clasificadas en macro (Dg > 500 nm), micro o nanoemulsiones (Dg de 1-200 nm) (Tadros, 2014).

* Instituto Politécnico Nacional, Alcaldía Gustavo A. Madero, México.
Contacto: jbarrera@cinvestav.mx

Los surfactantes pueden ser sintéticos y orgánicos, no obstante, dada la contribución a la contaminación ambiental de los sintéticos, surfactantes degradables de origen microbiano como los ramnolípidos están en curso de estudio. Éstos son generados por bacterias del género *Pseudomonas*, principalmente, y están constituidos por una o dos ramnosas unidas a una cadena de ácido graso no polar, cuya longitud dependerá de la especie de microorganismo que las produce (Randhawa y Rahman, 2014). Surfactantes ramnolípidos de una ramnosa son llamados mono-ramnolípidos; con dos, di-ramnolípidos.

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación de la capacidad de una mezcla de mono-ramnolípidos derivados de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, para microemulsificar keroseno. La emulsión formada podría tener aplicación en la solución de problemas de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 fue obtenida de la Colección Nacional de Cultivos Microbianos y Celulares del Cinvestav-IPN. La cepa fue propagada en caldo nutritivo (BD Bioxon) a 37°C y 150 rpm por 24 h (Innova 40 de New Brunswick Scientific), y recuperada por centrifugación a 10,000 rpm por 15 min (Allegra X-22R Centrifuge de Beckman Coulter) para su liofilización (liofilizador Labconco FreeZone 2.5) y posterior conservación a 4°C (refrigerador Nieto modelo RB630ANC). Los mono-ramnolípidos fueron producidos con el método reportado por Zhang *et al.* (1997), pero con glicerol a 3% (pureza 99%, High Purity) como fuente de carbono. Los mono-ramnolípidos fueron separados por extracción líquido-líquido con acetato de etilo (1:1) (pureza 99.5%, Química Rique). El surfactante fue purificado por cromatografía en columna (sílica gel activada, 60-200 Mesh, de JT. Baker) y conservado a -76°C (Ultracongelador Thermo Scientific TSE320A modelo 931) (Guatemala-Hernández *et al.*, 2021).

La microemulsión fue elaborada por un método de alta energía (agitación-ultrasonido) variando la composición de los diferentes componentes:

mono-ramnolípidos de 1.8 a 5.29%; etanol de 2.8 a 16%; keroseno de 1.1 a 104%; y agua desionizada de 60.9 a 91.1%. Los ramnolípidos en solución alcohólica (10%) (pureza >99.5% Química Rique) fueron mezclados (parrilla de calentamiento Heidolph MR Hei-Tec) con keroseno (1.1-104%) (JT. Baker). Posteriormente se adicionó agua desionizada lentamente bajo condiciones de agitación (1,400 rpm) y aumento gradual de temperatura (de 45°C a 70°C) buscando observar un cambio en la textura de la emulsión, de opaca a transparente. Emulsiones de apariencia lechosa fueron tratadas posteriormente con ultrasonido (40 KW en ciclos de 4 min) (ultrasonic procesor Hielscher UP200Ht).

La microemulsión fue analizada para determinación de pH (potenciómetro Eutech, Oakton, Vernon Hills, IL, USA), Dg (microscopía electrónica de transmisión, TEM), tipo de emulsión (test de tinción y fusión de gota) y estabilidad. El análisis TEM se realizó con muestras de microemulsión de 10 µL colocadas en rejillas de cobre y teñidas durante 1 min con ácido fosfotúngstico filtrado y ajustado a pH 7.0 (Lemus-de la Cruz *et al.*, 2022). El exceso de líquido de las muestras se secó con papel de filtro Whatman y las muestras se observaron directamente en el TEM JEM-1400 (JEOL, Peabody, MA, EE. UU.). La estabilidad de la microemulsión se determinó a partir del índice de cremación. El análisis comprendió la centrifugación de las microemulsiones a 1,500 rpm durante 30 min. El índice de cremación se calculó a partir de la siguiente ecuación: $\%IC = (CC/CT) \times 100$, donde CC es la altura de la capa de la crema y CT es la altura total del fluido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de surfactantes mono-ramnolípidos

Los mono-ramnolípidos obtenidos de *P. aeruginosa* (ATCC 9027) fueron obtenidos en una concentración de 1.2 gramos por litro de medio de cultivo (g L⁻¹). La estructura de estos surfactantes fue analizada por resonancia magnética nuclear y reportados en Guatemala-Hernández *et al.* (2021).

Keroseno emulsificado con mono-ramnolípidos

La variación porcentual de los diversos componentes empleados en la formulación de la micro-emulsión deseada dio lugar a los valores de Dg que se presentan en la tabla I. El menor Dg fue de 209.2 nm y fue obtenido con la formulación: mono-ramnolípidos, 1.9%; etanol, 15.2%; agua desionizada, 77%, y keroseno, 6% (%Rha/%Eth=0.13; %H₂O/%Ker =12.8). El aumento de la relación %H₂O/%Ker entre 12 y 34, para una relación %Rha/%Eth de 0.13 incrementó el Dg en 12%. Al aumentar la relación %Rha/%Eth, entre 0.13 y 17, para una relación %H₂O/%Ker de 34, el Dg incrementó en 44%.

A pesar del estrecho rango de variación de los diferentes componentes de la microemulsión, la variación del Dg permitió observar la importancia de la concentración en que se adicionan los surfactantes mono-ramnolípidos en etanol (%Rha/%Eth). Este resultado podría atribuirse al papel del etanol, que actúa como cosurfactante y solvente en la mezcla de mono-ramnolípidos, ya que estos últimos son poco solubles en agua. En el papel de cosurfactante, el etanol facilita la formación de una capa monomolecular del surfactante alrededor de las gotas de aceite, evitando la coalescencia y la separación de fases (Gupta *et al.*, 2016).

Forgiarini *et al.* (2008) reportaron que el tipo y la cantidad de alcohol determinarán el nivel de estabilidad de una emulsión, ya que los alcoholes muy hidrofílicos (de cadena corta) se solubilizarán preferiblemente en la fase acuosa, mientras que los alcoholes más lipofílicos (de cadena más larga) lo harán en la fase oleosa.

El desarrollo de una microemulsión demanda una cantidad de surfactante del orden de 20% (As-haolu, 2021). En el presente trabajo, la baja concentración utilizada (1.9%) podría atribuirse a la

Tabla I. Efecto de las relaciones (%Rha/%Eth) y (%H₂O/%Ker) en el diámetro de gota de la microemulsión %Ker/%H₂O/%Rha producidos por *P. aeruginosa*.

%Rha/%Eth	%H ₂ O/%Ker	Diam. gota (nm)
0.13	12.8	209.2
0.13	23.6	216.4
1.25	34.9	223.5
0.13	42.3	257.5
1.73	34.5	325.2

%Rha: mono-ramnolípidos; %Eth: etanol; %H₂O: agua desionizada; %Ker: keroseno.



Figura 1. Microemulsión keroseno (6%), agua (76.9%), etanol (15.2%) y mono-ramnolípidos (1.9%) obtenidos de *P. aeruginosa*.

estructura molecular de los mono-ramnolípidos, conformada por congéneres de diferente longitud de cadena de carbonos (Guatemala-Hernández *et al.*, 2021). Se asume que estructuras moleculares

variadas facilitan los procesos de desorción en los procesos de remediación de suelos contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos (Saeedi *et al.*, 2014). Nanoemulsiones preparadas con ramnolípido en dosis de 23% fueron reportadas por Bai y McClements (2016), y Al-Sakkaf y Onaizi (2023). Los primeros utilizaron como fase oleosa aceites vegetales y animales, en tanto que los segundos, hidrocarburos del petróleo. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son congruentes con lo reportado por estos autores.

Se observó que el aumento de mono-ramnolípido disminuye el tiempo de disgregación con ultrasonido del keroseno (figura 2), no obstante, el diámetro de gota estuvo determinado por otros factores: la relación %H₂O/%Ker. Por ejemplo, en una acumulación de mono-ramnolípido de 1.9%, el aumento en la relación %H₂O/%Ker de 12.8 a 42.3, disminuyó el tiempo de disgregación de 39.5 a 25.5 minutos, sin embargo, el diámetro de gota incrementó de 209 nm a 257 nm; mayor tiempo de ultrasonido no generó cambios significativos. Para una concentración de mono-ramnolípido de 3.8%, el diámetro de gota disminuyó de 223 nm a 216 nm al bajar la relación %H₂O/%Ker de 34.9 a 23.6. El aumento adicional de mono-ramnolípido de 37% a 5.2%, pero manteniendo constante la relación %H₂O/%Ker en 34.5 no favoreció la disgregación del keroseno, por el contrario, aumentó el diámetro de gota de 223 nm a 325 nm.

De acuerdo con Di *et al.* (2008), la formación de una microemulsión es función de las características de sus diferentes componentes, de su concentración y de la energía aplicada en la disgregación de la fase discreta. Lo reportado por estos autores corrobora los resultados obtenidos en el presente trabajo.

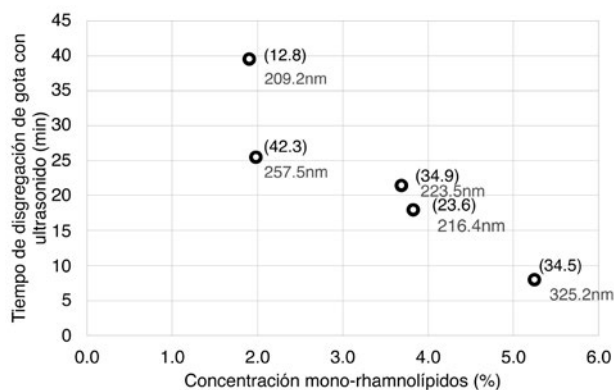


Figura 2. Tiempo de disgregación de gota con ultrasonido (40 KW) en función de la concentración de la mezcla de mono-ramnolípidos. Entre paréntesis (%H₂O/%Ker). En rojo, fuera del paréntesis, se indica el diámetro de gota de la microemulsión.

Caracterización de la microemulsión

La tinción de la microemulsión con cristal violeta permitió identificar y verificar la elaboración de la emulsión O/W deseada como se muestra en la figura 3.

El pH de la microemulsión se registró en un rango de 7.4-7.9, con una variación bimensual de 0.1. De acuerdo con Enríquez (2016), la variación de pH afecta la rigidez de las películas interfaciales agua-aceite. En el presente estudio la variación bimensual en 0.1 del pH corrobora la estabilidad de la emulsión formada.

El índice de cremación se registró en porcentajes inferiores a 5%. La capa de crema en la superficie de una microemulsión es resultado de la concentración de las gotas más grandes y menos densas de la fase dispersa, que tienden a ascender debido a la gravedad. Singh *et al.* (2017) reportaron que a menor porcentaje de cremosidad, mayor estabilidad de la emulsión. El valor de 5% aquí determinado indica la estabilidad de la emulsión formada.

En la figura 4 se muestra una micrografía del análisis TEM de la emulsión de composición 1.9/15.2/76.9/6 (%Rha/%Eth/%H₂O/%KER). La morfología circular de la gota es un indicador de la estabilidad de la emulsión preparada. El Dg calculado mediante el análisis TEM en todas las emulsiones preparadas (tabla I) estuvo en el rango 209 nm-325 nm, lo cual nos permite identificarlas como microemulsiones.

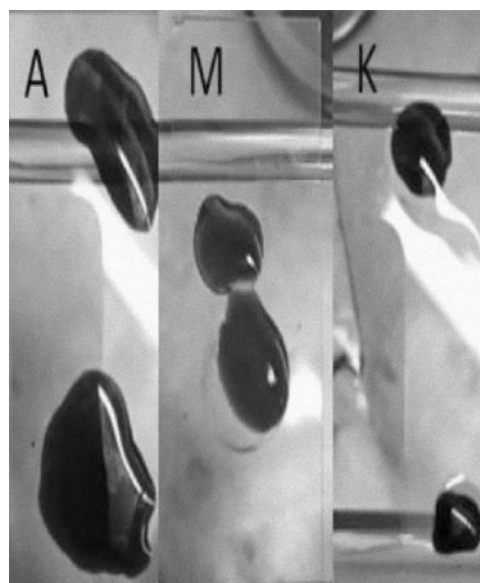


Figura 3. Test de tinción. Verificación de la elaboración de una microemulsión del tipo O/W.

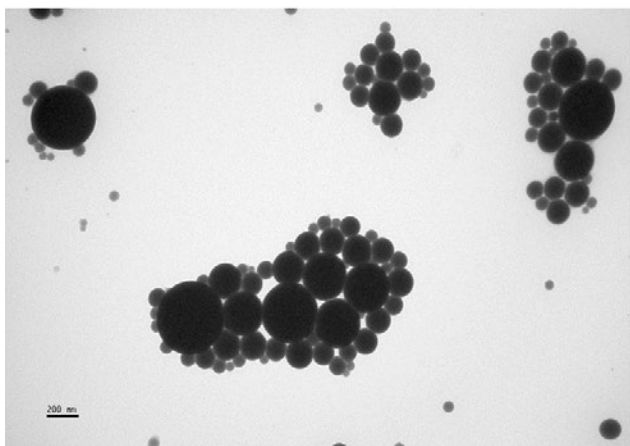


Figura 4. Análisis TEM de la emulsión de composición (%) 1.9/15.2/76.9/6 (mono-ramnolípidos/etanol/agua/keroseno).

Bai y McClements (2016) reportaron Dg en el rango 130 nm-167 nm, en nanoemulsiones O/W preparadas con una mezcla de mono y di-ramnolípidos a manera de agente surfactante y como fase oleosa aceite de maíz, aceite de pescado y aceite de limón. El mayor Dg obtenido en el presente trabajo, superior entre 25 y 60% al reportado por estos autores, podría atribuirse tanto a la compleja estructura molecular del keroseno, conformado por hidrocarburos alifáticos y aromáticos, además de la menor variedad en estructuras moleculares de los mono-ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* ATCC9027 (Guatemala-Hernández *et al.*, 2021). Una mezcla más diversificada de mono-ramnolípidos pudo haber favorecido el proceso de disgregación del queroseno; no obstante, para los propósitos de este estudio, el Dg obtenido se considera satisfactorio.

CONCLUSIÓN

Surfactantes mono-ramnolípidos generados por la cepa no patógena *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 permitieron microemulsificar keroseno en agua. Éstos son poco solubles en agua, por lo que fue necesario adicionarlos en etanol, solvente que jugó, además, el papel de cosurfactante. El keroseno es una mezcla compleja de hidrocarburos aromáticos y alifáticos de una larga cadena de carbonos, por tanto, su microemulsi-

ficación demandó aplicar ultrasonido al reducir el diámetro de gota hasta 209.2 nm. Se asume que este diámetro de gota es adecuado para la aplicación de la microemulsión en problemas de desorción de hidrocarburos sorbidos en partículas de suelo.

REFERENCIAS

- Al-Sakkaf, M.K., y Onaizi, S.A. (2023). Crude oil/water nanoemulsions stabilized by rhamnolipid biosurfactant: Effects of acidity/basicity and salinity on emulsion characteristics, stability, and demulsification, *Fuel*, 344:128052.
- Ashaolu, T.J. (2021). Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 19:33813395.
- Bai, L., y McClements, D.J. (2016). Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids, *Journal of Colloid and Interface Science*, 479:71-79.
- Di, S., Escalona, Y., Quijada, K., *et al.* (2008). Estudio del mezclado de emulsiones concentradas de aceite en agua aplicando la metodología de superficie de respuesta, *Revista Facultad de Ingeniería, UCV*, 23(3):53-64.
- Enríquez, O. (2016). *Fundamentos de las emulsiones agua-aceite crudo y su aplicación en la industria petrolera* (tesis de pregrado), Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Forgiarini, A., Pietrangeli, G., Arandia, *et al.* (2008). *Influencia del tipo de alcohol sobre la formación de nanoemulsiones de aceite de soja-en-agua*, Universidad de los Andes Mérida, 501, Venezuela.
- Guatemala-Hernández, C., Barrera-Cortés, J., Cerda García-Rojas, C.M., *et al.* (2021). Weathered Railroad Diesel Removed from a Loamy Sand Soil by Means of Mono-rhamnolipids, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 30(3):350372.
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., *et al.* (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications, *Soft Matter*, 12(11):2826-2841.

Khan, B.A., Akhtar, N., Khan, H.M.S., *et al.* (2011). Basics of pharmaceutical emulsions: A review, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(25):2715-2725.

Lemus-de la Cruz, A.S., Barrera-Cortés, J., Lina-García, L.P., *et al.* (2022). Nanoemulsified Formulation of *Cedrela odorata* Essential Oil and Its Larvicidal Effect against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Molecules*, 27:2975.

McClements, D.J., Decker, E.A., y Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components, *Journal of Food Science*, 72:R109-R124.

Randhawa, K.K.S., y Rahman, P.K.S.M. (2014). Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market, *Frontiers in microbiology*, 5(454):1-7.

Saeedi, L.H., Assadi, M.M., Heydarian, S.M., *et al.* (2014). The Production and Evaluation of a Nano-biosurfactant, *Petroleum Science and Technology*, 32(2):125-132.

Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., *et al.* (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 252:28-49.

Tadros, T.F. (2014). *An Introduction to Surfactants*, De Gruyter, Berlin, Boston.

Zhang, Y., Maier, W.J., y Miller, R.M. (1997). Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene, *Environmental Science & Technology*, 31:2211-17.

Recibido: 27/11/2023
Aceptado: 13/03/2024

Descarga aquí nuestra versión digital.

