

AUMENTO DA ESCALA, ESTUDO DA ESTABILIDADE E ESTIMATIVA DOS CUSTOS DE MANUTENÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Candida guilliermondii*

P. P. F. BRASILEIRO^{1,2}, B. A. C. ROQUE¹, I. J. B. DURVAL², N. M. P. da ROCHA e SILVA², F. C. P. da ROCHA e SILVA², R. C. F. SOARES da SILVA², D. K. F. dos SANTOS², J. M. de LUNA^{1,2}, R. D. RUFINO^{1,2}, L. A. SARUBBO^{1,2} e V. A. dos SANTOS^{1,2}

¹ Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Centro de Ciências e Tecnologia (CCT)

² Centro de Gestão de Tecnologia e Inovação (CGTI)

E-mail para contato: ppfbrasileiro@hotmail.com

RESUMO – Acidentes petrolíferos causam uma elevada toxicidade na fauna e na flora marinhas, o que requer a contenção dos hidrocarbonetos por agentes denominados de biossurfactantes. O trabalho, pois, apresenta o *scale up*, de frascos de *Erlenmeyer* para um biorreator de 50 L, da produção do surfactante de *Candida guilliermondii* cultivada em 4,0% de milhocina, 2,5% de melaço e 2,5% de óleo de soja. Este tensoativo foi submetido ao sorbato com e sem vapor fluente e à tinalização fracionada, sendo verificadas as propriedades surfactantes em condições de pH, salinidade e aquecimento durante 120 dias. A melhor conservação foi a de sorbato com vapor com tensão superficial mínima de 27,64 mN/m, emulsões de 100,0% e dispersão máxima de 92,9%. A estimativa do custo, todavia, indicou a redução de 10,6% dos gastos sob sorbato sem o vapor com propriedades similares. Logo, o biossurfactante produzido em reator deve ser mantido com sorbato e sem vapor para melhor remediar áreas contaminadas por petróleo.

1. INTRODUÇÃO

A cada ano, cerca de 5 milhões de toneladas de petróleo são transportados por navios para o abastecimento das grandes indústrias com o teórico comprometimento das normas de segurança para evitar possíveis derramamentos. Outrossim, as enormes plataformas de perfuração nos oceanos deveriam ter a responsabilidade de manter uma estrutura com mecanismos de garantia para impedir vazamentos em larga escala. Em 2010, o desastre ambiental ocorrido no Golfo do México, no entanto, contrapôs a habilidade do ser humano em ter o controle adequado da plataforma *Deepwater Horizon*, a qual não conseguiu assegurar cerca 780 milhões de litros da mistura de óleos e hidrocarbonetos, alastrando um desequilíbrio na fauna e flora marinhas por 1,5 km de profundidade (SPIER *et al.*, 2013).

A inexperiência em situações drásticas, o prejuízo financeiro causado, a preocupação com elevadas multas ambientais e o medo das revelações feitas pela imprensa internacional a todo o planeta fizeram os cientistas utilizarem a maioria dos recursos disponíveis para concertarem a falha

cometida. Dentre as soluções aplicadas, a mais eficaz fora o uso de surfactantes químicos cujo caráter anfipático permite a união entre compostos hidrofóbicos e hidrofílicos, facilitando a retirada dessas emulsões formadas pela redução da viscosidade do sistema monofásico água/óleo. Apesar de ser a mais sensata decisão dentre as disponíveis, aplicada apenas onze dias após o desastre, não foi o suficiente o bastante para evitar que os resquícios de óleo fossem espalhados a 790 km de extensão nas costas marinhas após 16 meses do derramamento. Ademais, a intoxicação do ambiente marinho foi intensificada pela origem petroderivada dos dispersantes químicos (AL-MAJED *et al.*, 2012).

A pesquisa existe para inventar novas soluções para pontos inconclusos, mantendo-se uma base para o desenvolvimento da ideia. A aplicação de surfactantes, pois, necessita apenas da subtração do teor da toxicidade e do aumento da biodegradabilidade, refletindo o uso da microbiologia para corrigir esse modo de remediação. Logo, o inóculo de micro-organismos com potencial biotecnológico em substratos provenientes de resíduos industriais permite o barateamento do custo de produção e a síntese dos biossurfactantes: os biorremediadores do petróleo (RUTA e JUOZAS, 2013).

A importância do uso de dispersantes químicos ou bioquímicos fundamenta-se na possibilidade do máximo contato entre o agente remediador e o contaminante, fator inexistente nas queimas locais ou no uso de barreiras físicas. Os métodos mecânicos citados não têm a habilidade de controlar o petróleo em elevadas profundidades, porém os surfactantes apresentam características adequadas para espalharem-se com mais facilidade e para reduzirem as forças repulsivas entre o meio aquoso e os petroderivados. Essas propriedades são denominadas, respectivamente, de tensões superficial e interfacial, as quais influenciam as demais particularidades como as emulsões e as dispersões (AL-YAARI *et al.*, 2014).

O estudo tem, por conseguinte, as finalidades de: estabelecer o *scale up* da produção da escala laboratorial, em máquina agitadora *shaker*, para a piloto industrial, em um biorreator de 50,0 L de capacidade volumétrica; determinar as melhores propriedades físico-químicas entre três métodos de conservação durante 120 dias; verificar os custos de estabilização e selecionar a melhor metodologia de manutenção do biossurfactante. Esse biocomposto foi sintetizado pela levedura *Candida guilliermondii* em um meio de produção 100% formado por resíduos industriais e está um estágio bem avançado para a aplicação em derramamentos petrolíferos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo e Substratos

A levedura *Candida guilliermondii* (UCP0992), depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco foi utilizada como produtora do biossurfactante. A repicagem desse organismo microbiano ocorreu a cada 30 dias para tubos de ensaio contendo o meio sólido de *Yeast Mold Agar* (YMA). Como fontes de energia, para a produção do biossurfactante, foram utilizados a milhocina, o melaço e o resíduo industrial da refinaria de óleo de soja (SANTOS *et al.*, 2013).

2.2. Meios de Manutenção, de Crescimento do Inóculo e de Produção do

Biossurfactante

A levedura foi mantida através da mistura sólida de YMA, composta por: extrato de malte (0,3%), extrato de levedura (0,3%), D-glicose (1,0%), triptona (0,5%), ágar bacteriano (2,0%) e água destilada q.s.p. (100 mL). Os componentes foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. A exclusão do ágar propicia à mistura o estado líquido e é denominada de *Yeast Mold Broth* (YMB), indicando o meio de crescimento da levedura. O meio de produção foi composto pelo acréscimo de 4,0% de milhocina e 2,5% de melaço do volume inicial, o pH foi ajustado para 5,5, acrescentou-se 2,5% de resíduo de óleo de soja e todo o meio foi autoclavado a 121 °C por 20 min.

2.3. Preparação do Inóculo e Produção do Biossurfactante

O inóculo tornou-se padrão pela transferência da *C. guilliermondii* para um tubo de ensaio, contendo o meio YMA, com a finalidade de se obter uma cultura jovem, em temperatura ambiente (25 °C). Logo após, as leveduras foram transferidas asépticamente até um frasco com YMB estéril. Por fim, o *Erlenmeyer* do YMB foi posto à agitação na máquina incubadora *shaker* durante 24 horas, a 200 rpm e sob 28 °C.

Para a produção do biossurfactante em *shaker*, após o crescimento do inóculo em meio YMB, foi realizada uma diluição seriada para a contagem das células por mililitro e calculado o volume para alcançar a concentração de 10^4 células/mL. Esse volume determinado foi inserido em frascos de *Erlenmeyer* com 2 L de capacidade volumétrica, contendo o meio de produção estéril, sob agitação em orbital a 200 rpm, a 28 °C e durante 144 horas, como meio do inóculo na etapa inicial. Posteriormente, a fermentação para produção do biossurfactante em biorreator de 50 L foi realizada com 20 L do meio de produção, selecionado em *shaker*, estéril, incubado com a suspensão celular de 10^4 células/mL e sob agitação mecânica de 90 rpm, durante 144 horas e sob temperatura de 28 °C.

2.4. Isolamento do Biossurfactante, Determinação das Propriedades Surfactantes e Verificação do *Scale up*

Os líquidos metabólicos obtidos pelos *shaker* e biorreator foram centrifugados a 4500 rpm durante 15 min, filtrados à vácuo e submetidos ao processo de extração. O biossurfactante do biorreator passou também pela filtração simples devido à baixa agitação oferecida pela máquina piloto industrial. A extração consistiu no abaixamento do pH até 2 por solução de HCl 6,0 M, inserindo, em seguida, 2 volumes de metanol. Essa mistura foi refrigerada a -15 °C durante 24 horas, seca em estufa a 37 °C por 48 horas e mantida em dessecador até peso constante, calculando o produto em g/L (SOBRINHO *et al.*, 2008).

As tensões superficiais foram medidas pelo método do anel DU NUOY no tensiômetro KSV Sigma 70 (Finland), determinando-se a força limite (mN/m) para suspender o anel de platina sobre o líquido metabólico livre de células até a interface ar-líquido.

Para a determinação das emulsões, foram colocados em tubos de ensaio, 2 mL do biossurfactante acoplados isovolumetricamente ao óleo motor a 25 °C e 1 atm. Esses recipientes

foram agitados em *vórtex* durante 2 minutos e deixados, durante 24 horas, em repouso. O índice de emulsificação foi calculado pela razão entre a altura da emulsão formada e a altura total da mistura, sendo o valor multiplicado por 100 (COOPER e GOLDENBERG, 1987).

A capacidade de dispersão do óleo motor foi simulada em placa de *Petri* (14 cm de diâmetro), contendo 100 mL da água do mar, coletada nas proximidades do sistema de captação do gerador de energia da Termelétrica de Pernambuco, localizada no Complexo Portuário de Suape. Uma quantidade desse óleo foi colocada no centro da placa, adicionando posteriormente a proporção (v/v) do surfactante microbiano de 1:1 (biossurfactante/óleo motor). Os valores foram medidos pela percentagem do diâmetro do halo, formado com a adição do biossurfactante, pelo da placa. (MORIKAWA *et al.*, 2000).

O *scale up* foi verificado pela comparação dessas propriedades físico-químicas e da extração obtida.

2.5. Estabilização do Biotensoativo

A estabilização do surfactante microbiano ocorreu quando 0,2% do sal sorbato de potássio foi adicionado e o líquido dividido em vidros de armazenamento, em triplicata, para a verificação das propriedades surfactantes nos períodos de 0, 15, 30, 45, 90 e 120 dias. Em cada um desses dias, foram alteradas as condições de potencial hidrogeniônico para 6, 8 e 10; adicionadas percentagens de NaCl a 1, 3 e 5% do volume a ser estudado e aquecidas as amostras durante 30 min a 40 e 50 °C. Para avaliar as propriedades surfactantes, foram mensuradas as melhores médias de cada condição nas tensões superficiais e nos índices de emulsificação e de dispersão.

2.6. Seleção da Metodologia de Conservação Mais Estável e das Melhores Variações Físico-químicas Diante de uma Estimativa do Custo no Processo de Manutenção das Propriedades Surfactantes

Após os experimentos de estabilidade do biossurfactante produzido em biorreator, foi construída uma tabela baseada exclusivamente nos preços do sorbato de potássio e da quantidade de energia gasta para a manutenção do surfactante microbiano.

A tabela consistiu no preço comercial por quilograma do sorbato de potássio genérico, 100,00 R\$/kg, alterando a taxa para a quantidade em gramas 0,10 R\$/g, multiplicada pela percentagem de 0,2% e pelo volume (mL) do surfactante a ser tratado. Ademais, a energia da autoclave (50 L) e do banho-maria (6 L) foi calculada pelo consumo de kWh, admitindo a eficiência das máquinas de 70%, as potências, de 3000 e 600 W, e a duração dos processo de 80 e 30 min, respectivamente. O preço do quilowatt, 0,42283 R\$/kWh foi referente ao grupo NEOENERGIA de acordo com a Resolução Homologatória da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), número 1519 do dia 23 de abril de 2013, adicionado do Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Prestação de Serviços (ICMS) referente ao mês de maio de 2013 (CELPE, 2013).

A partir desses custos, construiu-se uma tabela proporcional à quantidade de volume (L) do

surfactante microbiano, seja para a adição do sorbato, calculando o preço de acordo com a massa do conservante empregado, ou para até 2/3 do volume da autoclave ou do banho-maria, percentagem segura para a assepsia. Dado um valor maior dos 2/3, multiplicou-se o volume original por um valor inteiro até que esteja na faixa permitida de segurança. É notório, na prática, que trocadores de calor mais adaptados podem facilmente ter uma eficiência maior e um custo energético menor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. *Scale Up* da *Shaker* para o Biorreator

O grande apanágio da substituição do local de crescimento no meio de produção do biossurfactante foi o rendimento obtido após a fermentação. Esse, comparado à *shaker* de produção 8,5 g/L, ascendeu a 32,0 g/L, demonstrando a relevante eficiência do biorreator. Ademais, os índices de emulsificação foram semelhantes, 90,5% para a *shaker* e 90,1% para o biorreator.

As propriedades, cuja eficiência diminuiu, foram as tensões superficiais, de 31,30 a 34,70 mN/m, e os índices de dispersão, de 57,1 para 21,4%. O que reflete a necessidade do estudo de cada propriedade do volume a ser produzido desse biossurfactante, envolvendo agitação, aeração, formato das pás agitadoras, volume e pH a fim de se obter as condições ideais para produção do biodetergente.

3.2. Estabilidade do Biossurfactante pelas Metodologias de Conservação

Dentre as metodologias de conservação, o sorbato com vapor fluente apresentou 48,1% das melhores tensões superficiais, conforme a figura 1-B, incluindo a menor força repulsiva de 27,64 mN/m aos 45 dias e em pH 10. A adição do sorbato sem vapor, na figura 1-A, caracterizou 20,4% das menores tensões, sendo os 31,5% restantes referentes à tinalização fracionada, na figura 1-C.

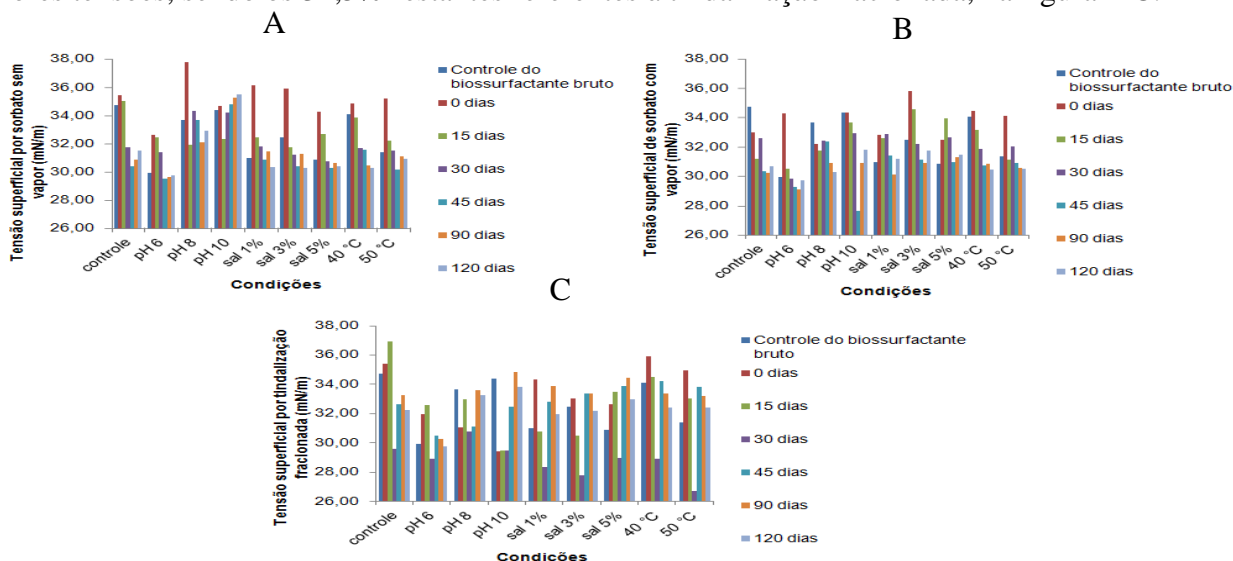


Figura 1 - Comparação das tensões superficiais do biossurfactante submetido às metodologias de sorbato sem vapor (A), sorbato com vapor (B) e tinalização fracionada (C) durante 120 dias.

Nas percentagens de emulsões, os maiores índices (46,3%) ocorreram no sorbato sem vapor, na figura 2-A, com oito índices de total emulsificação até os 120 dias de experimento, seguidos por 33,3% da tinalização fracionada, na figura 2-C, e 20,4% do sorbato com vapor, na figura 2-B.

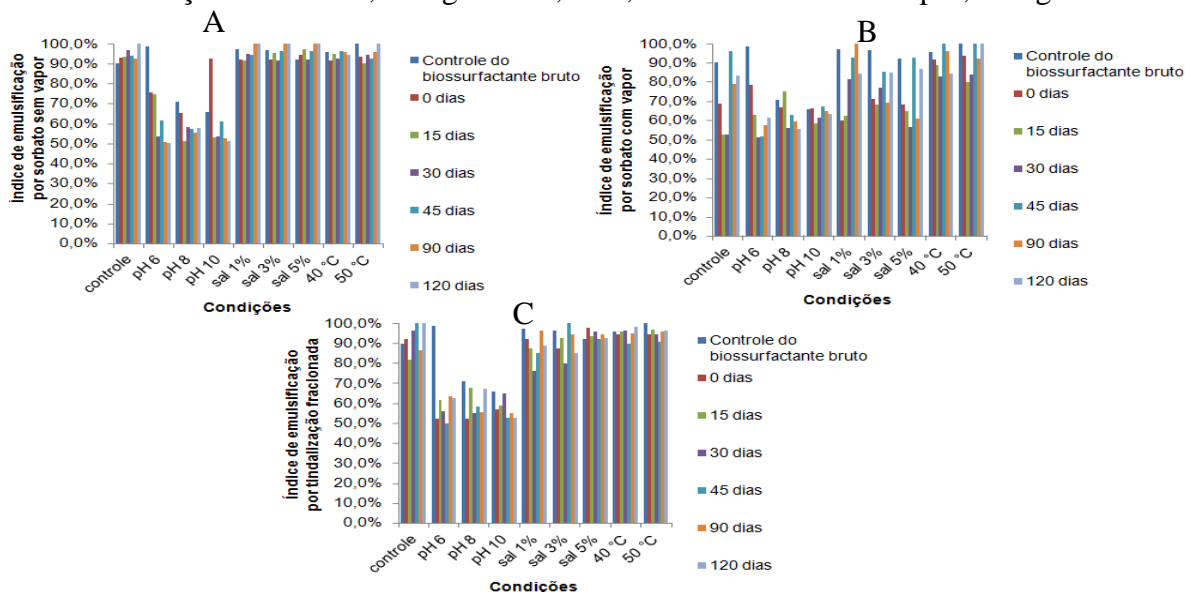


Figura 2 - Comparação dos índices de emulsificação do biossurfactante submetido às metodologias de sorbato sem vapor (A), sorbato com vapor (B) e tinalização fracionada (C) durante 120 dias.

A mais efetiva metodologia foi a de sorbato com vapor (46,3%), na figura 3-B; seguida pelo sorbato sem vapor (40,7%), na figura 3-A, e pela tinalização fracionada (13,0%), na figura 3-C, com a maior dispersão no tempo inicial de 97,9%.

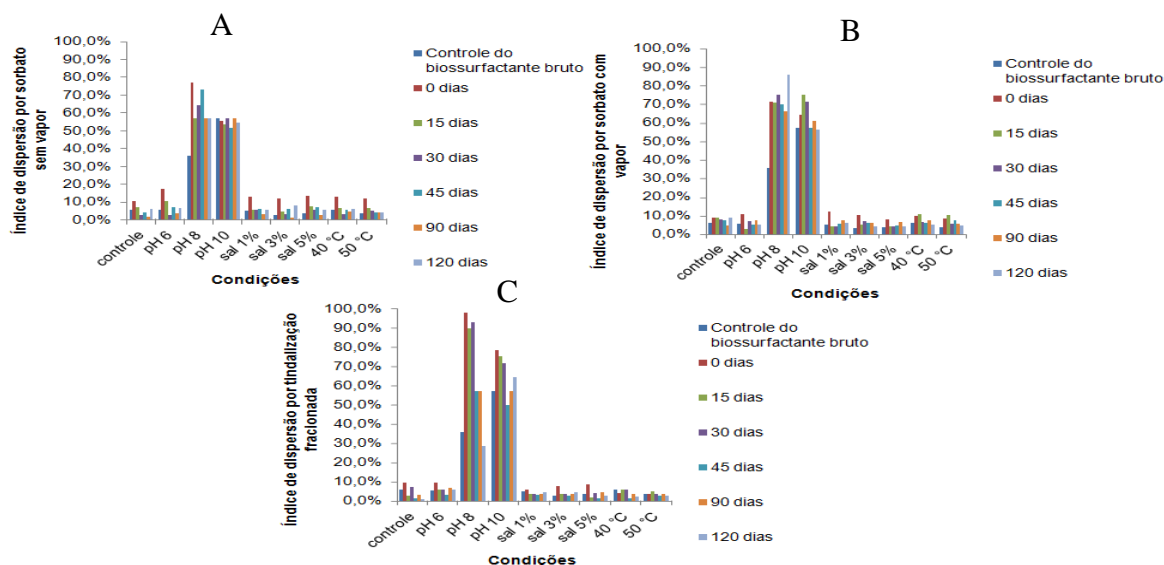


Figura 3 - Comparação dos índices de dispersão do biossurfactante submetido às metodologias de sorbato sem vapor (A), sorbato com vapor (B) e tinalização fracionada (C) durante 120 dias.

3.3. Estimativa do Custo de Conservação do Biossurfactante Produzido em Biorreator e Seleção da Mais Estável Metodologia de Conservação e das Melhores Condições de pH, salinidade e temperatura

No derramamento no Golfo do México, os cientistas utilizaram cerca de 7 milhões de litros de dispersantes químicos (ZHOU *et al.*, 2013). Da ordem de grandeza dessa medida, na tabela 1, foram estimados os gastos, em reais, exclusivamente da quantidade de sorbato aplicável com porcentagens de 0,2% e da energia gasta durante os processos de conservação.

Tabela 1 – Estimativa de gastos, em reais, da quantidade de sorbato aplicável com porcentagens de 0,2% e da energia durante os processos de conservação do biossurfactante

Volume do biossurfactante (L)	Metodologias de conservação (reais)			
	Sorbato	Tindalização	Vapor + Sorbato	Vapor
1	0,21	3,54	0,30	0,09
10	2,08	3,54	2,35	0,27
100	20,80	10,62	23,02	2,22
1000	208,00	106,20	230,20	22,20
10000	2080,00	1062,00	2301,99	221,99
100000	20800,00	10620,00	23019,86	2219,86
1000000	208000,00	106200,00	230198,58	22198,58
10000000	2080000,00	1062000,00	2301985,75	221985,75

O método de vapor fluente sem sorbato foi o que apresentou o menor custo e, portanto, deve ser realizado, bem como o da ausência de conservantes. Como essas metodologias não foram empregadas, o processo mais eficaz e econômico foi o de adição de sorbato de potássio, pois apesar das pequenas diferenças do gasto (10,6%) e da estabilidade, em nível industrial, entre o sorbato e o vapor com sorbato, necessita-se considerar vários fatores. Desses parâmetros, podem se especificar o transporte e armazenagem do sal de potássio para a conservação apenas com sorbato, todavia o acréscimo do aquecimento a 80 °C requer a manutenção, supervisão, limpeza, troca, dentre outros gastos com a máquina térmica. Esses parâmetros ratificam a metodologia de sorbato de potássio a 0,2% como a mais eficaz e eficiente no processo de conservação durante 120 dias do biossurfactante.

4. CONCLUSÕES

O aumento da escala surpreendeu a variação do rendimento, cerca de 4 vezes maior perante a extração da escala laboratorial, e o bioproduto mostrou-se eficiente quanto à estabilidade das tensões superficiais e índices de emulsificação. Por outro lado, a produção em maior escala inviabilizou o uso do biossurfactante para a dispersão de compostos hidrofóbicos sem a alteração do pH para 8 ou 10. Essa redução das dispersões, portanto, pode ter ocorrido devido à baixa agitação de 90 rpm exercida pelo biorreator, diminuindo possivelmente a atuação entre o micro-organismo e o substrato. Os resultados obtidos também demonstram a importância do *scale up* de produção do biossurfactante e a possibilidade de obtenção de um biodetergente comercial formulado com sorbato de potássio a 0,2%,

alterado ao potencial hidrogeniônico 8, salinidade 5% ou aquecimento a 50 °C durante 30 minutos, e estável com relevância na área ambiental.

O projeto sobre os biossurfactantes, detentor de uma fonte mesclada de conhecimento, está em um estágio bastante avançado, necessitando de estudos mais aprofundados para a obtenção de definições ideais de produção e aplicação desse inovador produto biotecnológico.

5. REFERÊNCIAS

- AL-MAJED, A. A.; ADEBAYO, A. R.; HOSSAIN, M. E. A sustainable approach to controlling oil spills. *J. Environ. Manage.*, v. 113, p. 213-227, 2012.
- AL-YAARI, M.; AL-SARKHI, A.; HUSSEIN, I. A.; CHANG, F.; ABBAD, M. Flow characteristics of surfactant stabilized water-in-oil emulsions. *Chem. Eng. Res. Des.*, v. 92, p. 405-412, 2014.
- CELPE. Companhia Energética de Pernambuco. Disponível em: <http://www.celpe.com.br/Aplicacoes/Orientacao/orientacoes_energia.asp?c=17&tensao=Baixa>. Acesso em: 30 jun. 2013.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from two *Bacillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, p. 224-229, 1987.
- MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1488, p. 211-218, 2000.
- RUTA, I-G. e JUOZAS, K. Effects of rhamnolipid biosurfactant JBR425 and synthetic surfactant Surfynol465 on the peroxidase-catalyzed oxidation of 2-naphthol. *J. Environ. Sci.*, v. 25, p. 1431-1440, 2013.
- SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SALGUEIRO, A. A.; SARUBBO, L. A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *J. Petrol. Sci. Eng.*, v. 105, p. 43-50, 2013.
- SOBRINHO, H. B. S. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochem.*, v. 43, p. 912-917, 2008.
- SPIER, C.; STRINGFELLOW, W. T.; HAZEN, T. C.; CONRAD, M. Distribution of hydrocarbons released during the 2010 MC252 oil spill in deep offshore waters. *Environ. Pollut.*, v. 173, p. 224-230, 2013.
- ZHOU, Z.; GUO, L.; SHILLER, A. M.; LOHRENZ, S. E.; ASPER, V. L.; OSBURN, C. L. Characterization of oil components from the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico using fluorescence EEM and PARAFAC techniques. *Mar. chem.*, v. 148, p. 10-21, 2014.