

# SCALE-UP DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *CANDIDA SPHAERICA* UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAS

A. A. L. PINTO<sup>1</sup>, B.A.C. ROQUE<sup>1</sup>, P.P.F. BRASILEIRO<sup>1,2</sup>, R.D. RUFINO<sup>1,2</sup>, J.M. LUNA<sup>1,2</sup> e  
L.A.SARUBBO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Católica de Pernambuco, Centro de Ciências e Tecnologia

<sup>2</sup> Centro de Gestão de Tecnologia e Inovação, CGTI

E-mail para contato: julianamouraluna@gmail.com

**RESUMO** – O desenvolvimento de surfactantes biodegradáveis e menos tóxicos, como os biossurfactantes microbianos, torna-se uma estratégia importante na obtenção de compostos compatíveis com o meio ambiente. Nesse trabalho, foi realizado a produção de biossurfactante em biorreator de 50L em meio contendo água destilada suplementada com 9,0% de resíduo industrial e 9,0% de milhocina, durante 144 horas a 28 °C e 90 rpm. O rendimento do biossurfactante isolado foi de 21,49 g/L e uma excelente capacidade de redução de tensão superficial (27,00 mN/m). Testes para a determinação do índice de emulsificação foram realizados e os melhores percentuais foram obtidos para óleo motor (85,71%), seguido de óleo de milho (37,14%). Os resultados demonstraram que o “scale-up” permitiu o aumento do rendimento em biossurfactante e a manutenção da tensão superficial reduzida, apresentando potencial para a aplicação industrial do biossurfactante de *Candida sphearica* na remediação de ambientes aquáticos contaminados por petróleo.

## 1. INTRODUÇÃO

As refinarias são grandes geradoras de poluição. Elas consomem enormes quantidades de água e de energia, produzem muitos despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição. Em decorrência de tais fatos, a indústria de refino de petróleo, pode ser, e é muitas vezes, uma grande degradadora do meio ambiente, pois tem potencial para afetar o mesmo em todos os níveis ecológicos: ar, água e solo (Gonzini *et al.*, 2010).

O maior acidente de derramamento de petróleo do mundo aconteceu em 2010 no Golfo do México depois da explosão e afundamento de uma plataforma petrolífera ao largo da costa da Louisiana e do Mississipi, nos Estados Unidos. Depois do afundamento da plataforma, os dutos de exploração do petróleo continuaram abertos e jorrando no mar. Os relatórios oficiais indicam que escapam por dia o equivalente a mil barris de óleo, na área de perfuração a 1,5 Km de profundidade. O derramamento só foi estancado em três meses depois. Estima-se que uma quantidade entre 3 e 4 milhões de barris de petróleo vazou,

fazendo deste o maior acidente ambiental da história dos Estados Unidos (British Petroleum, 2010).

Os acidentes ocorridos com derramamentos de petróleo e seus derivados no Brasil, no período de 1975 a 2005, também atingiram milhões de litros que contaminaram solos, rios e mares. Diante dessa realidade, a possibilidade de contaminação ambiental torna-se real e iminente, havendo necessidade de aplicação de tecnologias que possam conter possíveis contaminações (Silva *et al.*, 2010).

A contaminação por petróleo e derivados normalmente é tratada através de metodologias físicas, químicas ou biológicas. Entretanto, as novas diretrizes de recuperação de águas e solos têm restringido o uso de produtos químicos (Muthusamy *et al.*, 2008). Dentre as técnicas de remediação disponíveis, a biorremediação tem se destacado, embora a solubilidade reduzida dos hidrocarbonetos dificulte o acesso dos micro-organismos e a consequente biodegradação do poluente (Calvo *et al.*, 2009).

A utilização de compostos surfactantes torna-se uma alternativa atrativa na remoção de contaminantes hidrofóbicos gerados pela indústria de petróleo (Luna *et al.*, 2013). Os surfactantes são compostos anfipáticos que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, apresentando várias aplicações industriais (Rufino *et al.*, 2014). A grande maioria dos surfactantes disponível comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a necessidade de preservação ambiental e as legislações de controle do ambiente têm levado pesquisadores à procura por produtos naturais como alternativas aos produtos existentes. Nesse contexto, destacam-se os surfactantes de origem microbiológica, os biossurfactantes, produzidos principalmente por bactérias e leveduras (Cortis; Ghezzehei, 2007).

A possibilidade de produção dos biossurfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros culturais como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH do meio e nutrientes adicionados, possibilita a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com os similares sintéticos (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi produzir o biossurfactante em larga escala por *Candida sphaerica* com vistas à aplicação dessas biomoléculas como coadjuvantes dos processos de remediação de poluentes hidrofóbicos gerados na indústria de petróleo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismo

*Candida sphaerica* UCP 0995 depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco foi testada como produtora do biossurfactante.

### 2.2. Produção do biossurfactante

Shaker: A fermentação para produção do biossurfactante foi realizada em frascos de Erlenmeyer com 500 ml de capacidade contendo 100mL do meio de produção e incubados com a suspensão celular de  $10^4$  células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, durante 144 horas, à temperatura de 28°C.

Biorreator: A produção do biossurfactante foi realizado em biorreator de 50L sob condições de cultivo e em meio formulado contendo água destilada com 9% do resíduo de refinaria de óleo vegetal de soja e 9% de milhocina sob agitação de 90rpm, durante 144 horas a 28°C.

### 2.3. Isolamento do biossurfactante

O biossurfactante bruto, após centrifugação a 4 500 rpm por 20 minutos a 10°C para retirada das células, o pH do biossurfactante bruto foi ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 M e precipitado com 2 volumes de metanol. Após repouso durante 24 horas, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos, lavadas com metanol e deixadas a precipitar por 48 horas (Souza Sobrinho *et al.*, 2008).

### 2.4. Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação das atividades de emulsificação, amostras do líquido metabólico livre de células do biossurfactante formulado foram analisadas segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987): 1,0 mL de um substrato oleoso (óleo motor, óleo de milho e óleo de soja) foi adicionado a 1,0 mL do líquido metabólico em tubo graduado e a mistura agitada em vortex por 2 minutos. Após 24 horas as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros, devido à altura do halo formado.

## 2.5. Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células do biossurfactante formulados foi medida em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Determinação das propriedades do biossurfactante produzido em shaker e biorreator

O emprego de biorreatores torna-se uma alternativa ainda mais atrativa e promissora quando comparada com as limitações sob o ponto de vista técnico e/ou econômico das técnicas de bancada utilizadas, como a utilização de mesas agitadoras tipo shaker.

Além disso, os biorreatores são sistemas completamente fechados que permitem o controle de emissões e apresentam vantagens tais como: monitoramento efetivo do processo, maior controle das variáveis do processo (valor de pH, temperatura, umidade, etc.), melhor incorporação de aditivos, redução do tempo de processo (Alef; Nannipieri, 1995).

A tabela 1 mostra o estudo comparativo das propriedades do biossurfactante produzido em shaker e biorreator. O biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* apresentou uma redução da tensão superficial da água de 72,00 mN/m para 25,00 mN/m quando produzido em shaker, embora tenha apresentado uma pequena variação na tensão superficial de 27,00 mN/m quando produzido no biorreator.

Com relação ao rendimento em biossurfactante, foi observado um excelente resultado, já que a produção em shaker permitiu um rendimento de 8,0 g/L, enquanto que em biorreator o rendimento foi de 21,49 g/L em biossurfactante isolado. Testes para a determinação do índice de emulsificação foram realizados, observando-se que tanto em shaker quanto em biorreator os melhores resultados foram obtidos para o óleo motor, seguido de óleo de milho (Tabela 1).

Tabela 1– Estudo comparativo da produção de biossurfactante produzido em shaker e biorreator com avaliação da tensão superficial, rendimento em biossurfactante e índice de emulsificação

Produção do biossurfactante	Tensão Superficial	Índice de emulsificação			Rendimento
		Óleo Motor	Óleo de Milho	Óleo de Soja	
Shaker	25,00 mN/m	78,12%	21,74%	24,0 %	8,0 g/L
Biorreator	27,48 mN/m	85,71%	37,14%	-	21,49 g/L

Brasileiro *et al.* (2013) observaram, para o biossurfactante produzido por *Candida guilliermondi* em meio contendo 4,0% de milhocina, 2,5% de óleo de soja e 2,5% de melação obteve uma tensão superficial 31,30 mN/m em shaker e 34,70 mN/m em biorreator. Enquanto que para a determinação da atividade de emulsificação, o biossurfactante produzido em shaker, apresentou índices de emulsificação de 25,9% para o óleo de soja e 90,5% para o óleo motor.

O biossurfactante produzido por *Pseudomonas cepacia* utilizando meio mineral e resíduos industriais demonstrou uma tensão superficial de 27,57 mN/m quando produzido em shaker, porém o mesmo resultado não foi obtido quando se realizou a fermentação em biorreator, apresentando uma tensão de 40,9 mN/m. O mesmo comportamento foi observado em relação ao rendimento em biossurfactante, onde a fermentação em shaker apresentou 5,2 g/L de rendimento, enquanto que a fermentação em biorreator apresentou 1,72g/L (Rocha e Silva *et al.*, 2014).



Figura 1- Produção de biossurfactante em shaker (A), Biorreator de 50L (B).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a ampliação de escala permitiu o aumento do rendimento em biossurfactante e a manutenção da tensão superficial reduzida, indicando a possibilidade da aplicação industrial do biossurfactante de *Candida sphaerica* na remediação de ambientes aquáticos contaminados por petróleo.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALEF, K. E NANNIPIERI, P. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Editora 1st, p.576, 1995.
- BRITISH PETROLEUM. *Deepwater horizon accident investigation report*. Golfo Do Mexico, p. 192, 2010.
- BRASILEIRO, P. P. F.; SOUZA FILHO, G. L.; SILVEIRA, G. N. M.; ROCHA E SILVA, N. M. P.; CAMPOS, J. M.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, W. A. E SARUBBO, L. A. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido em biorreator para biorremediação. VI Simpósio em Ciências Biológicas, Recife. 11-14 de novembro, 2013.
- CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LOPÉZ, J. Application of Bioemulsifiers in Soil Bioremediation Processes: Future Prospects. *Sci. total environ.*, v. 407, p.3634-3640, 2009.
- COOPER, D.G., GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *Bacillus species*. *Appl. Enviromen. Microbiol.* v.53, p. 224-229, 1987.
- GONZINI, O.; PLAZA, A.; DI PALMA, L.; LOBO, M. C. Electrokinetic remediation of gasoil contaminated soil enhanced by rhamnolipids. *J. Appl. Electrochem.*, p. 1239-1248, v. 40, 2010.

LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SARUBBO, L. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M., Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids surf B.*, p. 36, 2013.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science.*, v. 94, p. 736-747, 2008.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Intern. J. Mol. Science.*, v. 13, 633-654, 2011.

ROCHA E SILVA, N. M. P., RUFINO, R. D., LUNA, J. M., SANTOS, V. A., SARUBBO, L. A. Screening of *pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatal Agricultural Biotechnol.*, v. 3, p. 132-139, 2014.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron. J. Biotechnol.*, v. 17, pp. 34-38, 2014.

SOUZA SOBRINHO, B.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LEITE, L.F.C.; SARUBBO, L.A. Utilization of two agroindustrial by – products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochem.*, v. 43, p. 912-917, 2008.