

SCALE-UP DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *CANDIDA SPHAERICA* UTILIZANDO RESÍDUOS INDUSTRIAIS

A. A. L. PINTO¹, B.A.C. ROQUE¹, P.P.F. BRASILEIRO^{1,2}, R.D. RUFINO^{1,2}, J.M. LUNA^{1,2} e L.A.SARUBBO^{1,2}

¹ Universidade Católica de Pernambuco, Centro de Ciências e Tecnologia

² 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 sphaerica* 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 Mississippi, 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 guilliermondii* em meio contendo 4,0% de milhocina, 2,5% de óleo de soja e 2,5% de melaço 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.