

# FORMULAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *CANDIDA LIPOLYTICA* PARA APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS GERADOS PELA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO CONTIDOS EM ÁGUA DO MAR

H. S. AMORIM<sup>1</sup>, J. G. M. BRITO<sup>2</sup>, P. F. CORRÊA<sup>3</sup>, R. D. RUFINO<sup>4</sup>, J.M. LUNA<sup>5</sup>, L.A. SARUBBO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Católica de Pernambuco, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: henrique.siqueira.amorim@gmail.com

**RESUMO** – A recuperação da poluição por derramamentos de óleo é atualmente a preocupação das indústrias. Uma das alternativas para remediar a contaminação por compostos hidrofóbicos consiste na aplicação de biossurfactante. Nesse sentido, foi realizada a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* cultivada em meio mineral, 6% do resíduo de óleo vegetal e 1% de ácido glutâmico, durante 72 horas e 200 rpm. O biossurfactante produzido foi adicionado ao conservante comercial a fim de testar sua estabilidade frente a diferentes variações de pH, temperatura e sal. Em seguida o líquido metabólico, foi estocado à 28 °C por 120 dias, onde foram realizados testes de tensão superficial e índice de emulsificação. Os resultados obtidos demonstraram estabilidade na tensão superficial frente às variações de pH, temperatura e salinidade. Os melhores percentuais do índice de emulsificação foram para o óleo de motor. A biomolécula apresentou potencial para aplicação como agente de remediação ambiental.

## 1. INTRODUÇÃO

A liberação de contaminantes, tais como petróleo e derivados para o meio ambiente é uma das principais causas da poluição global (Saeki *et al.*, 2009). Os acidentes ocorridos com derramamentos de petróleo e seus derivados, como o ocorrido no Brasil, no período de 1975 a 2005 que atingiram milhões de litros e causaram a contaminação de solos, rios e mares, torna real e iminente a contaminação ambiental, havendo necessidade de aplicação de tecnologias que possam conter possíveis contaminações (Silva *et al.*, 2010).

A necessidade em remediar áreas contaminadas levou ao desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem a detoxificação destes contaminantes de forma não

convencional, ou seja, sem a utilização de métodos meramente químicos ou físicos. O uso de micro-organismos ou produtos microbianos para degradar compostos poluentes, é uma destas novas tecnologias, chamada de biorremediação (Fracchia *et al.*, 2012). É descrito por Calvo *et al.* (2009) como um processo de estimulação natural de micro-organismos na biodegradação de óleos e no tratamento de ambientes terrestres e aquáticos contaminados com compostos xenobióticos.

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial, oriunda das forças intermoleculares da água e possuem alta capacidade emulsificante, que é responsável por agregar moléculas a outras diferentes, são denominados biossurfactantes (Franzetti, 2010). Em comparação com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam uma toxicidade inferior, maior biodegradabilidade e compatibilidade ambiental, permitindo uma grande variedade de aplicações industriais que envolvem a detergência, a emulsificação, a lubrificação, a capacidade de formação de espuma, a molhabilidade, solubilização e a dispersão (Luna *et al.*, 2013).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos, resíduos da indústria de laticínios (soro de leite), melaço de cana e glicerina têm sido citados na literatura (Tuleva *et al.*, 2002). Luna *et al.* (2013), Coimbra *et al.* (2009) e Rufino *et al.* (2008) utilizaram resíduos industriais na produção de biossurfactantes, obtendo resultados satisfatórios em termos de tensão superficial.

Pattanath e colaboradores (2008) sugerem quatro fatores para a redução dos custos dos biossurfactantes: (1) os micro-organismos, (2) o processo, (3) o meio de cultura e (4) o processamento de produtos reciclados. Assim, a aplicação de biossurfactantes na recuperação avançada de petróleo depende da sua estabilidade em condições extremas de temperatura, salinidade e de pH, ou atividades em superfície. Muitos desses fatores ambientais podem influenciar as propriedades físico-químicas de um biossurfactante (JOSHI *et al.*, 2008).

Dessa forma, o presente trabalho teve como principal objetivo formular e estudar a estabilidade do biossurfactante produzido pela *Candida lipolytica* UCP0988 em meio de baixo custo, com vistas à aplicação dessa biomolécula como aditivo coadjuvante em processos de remediação de poluentes hidrofóbicos gerados pela indústria de petróleo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

A levedura do gênero *Candida lipolytica* UCP0988, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP, foi utilizada como micro-organismo produtor de biossurfactante. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio inclinados em meio Yeast Mold Ágar (YMA), contendo: extrato de levedura (0,3%); D-glicose (1,0%); Triptona (0,5%); Ágar (2,0%); Extrato de malte (0,3%), sob refrigeração a 5°C, sendo repicadas a cada 30 dias.

## **2.2. Produção do Biossurfactante**

O biossurfactante foi produzido em meio mineral contendo resíduos industriais como substratos (Rufino *et al.*, 2008).

## **2.3. Preparação do Inóculo**

O inóculo das leveduras foi padronizado, transferindo-se as culturas para um tubo contendo o meio YMA, a fim de se obter uma cultura jovem. Em seguida, a amostra foi transferida para frascos contendo 50 mL do meio Yeast Mold Broth (YMB) e incubados sob agitação de 200 rpm a 28°C durante 24 horas.

## **2.4. Conservação do Líquido Metabólico Contendo o Biossurfactante**

Para conservação do líquido metabólico (centrifugado e filtrado a vácuo e por gravidade) contendo o biossurfactante utilizou-se 0,2% de sorbato de potássio. Em seguida, o líquido metabólico com conservante foi estocado à temperatura ambiente durante 120 dias para observação da estabilidade do biopolímero. Testes foram realizados para determinação do tempo (0, 15, 30, 45, 90 e 120 dias) e temperatura (28-30 °C). Em cada intervalo de tempo foram determinadas: tensão superficial, capacidade de emulsificação e dispersão/agregação de composto hidrofóbico em água do mar.

## **2.5. Determinação das Atividades de Emulsificação**

Para a determinação das atividades de emulsificação, amostras dos líquidos metabólicos livre de células dos biossurfactantes formulados foram analisadas segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987): 1,0 mL de um substrato oleoso (petróleo, óleo de soja e óleo de milho) foram adicionados a 1,0 mL do líquido metabólico em tubo de ensaio e a mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto. Após 24 horas, as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros, devido à altura da emulsificação formada.

## **2.6. Determinação da Tensão Superficial**

A tensão superficial do líquido metabólico, livre de células, do biossurfactante formulado foi medida em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY. A tensão superficial foi medida através da imersão do anel de platina no líquido metabólico e registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido.

## 2.7. Avaliação da Estabilidade do Biossurfactante (Efeitos do pH, da Adição de NaCl e da Temperatura)

A estabilidade do biossurfactante também foi testada em diferentes temperaturas (40 e 50°C) durante 30 minutos, diferentes concentrações de NaCl (1, 3 e 5 %), e diferentes valores de pH (5, 7 e 9). Após essa etapa foram determinadas as atividades emulsificantes e tensoativas do biossurfactante formulado. Os testes determinaram a tensão superficial, a atividade de emulsificação e o teste de dispersão. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 2.8. Experimentos de Deslocamento (Dispersão/Agregação) de Composto Hidrofóbico em Água do Mar

A capacidade de dispersão ou agregação de manchas de derivados de petróleo foi simulada em laboratório, contaminando-se amostras de água do mar com óleo de motor. Os testes foram realizados pela adição de 20 µL do biossurfactante formulado, nas proporções de 1:2, 1:8 e 1:25 (v/v) em óleo motor. Os resultados foram observados visualmente.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Determinação da Tensão Superficial do Biossurfactante Frente à Adição de Sorbato de Potássio

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos referentes à avaliação da estabilidade da tensão superficial do líquido metabólico contendo o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica*.

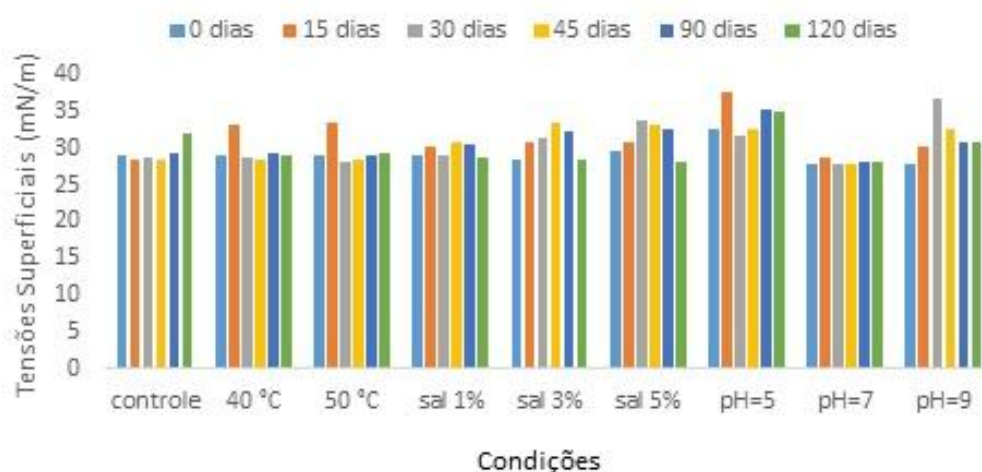


Figura 1 – Tensões superficiais do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica*.

O biossurfactante formulado na condição controle (28°C, ausência de NaCl e pH 6,0) apresentou uma tensão superficial de 28,46 mN/m. Ao longo dos 120 dias do experimento, de um modo geral, pode-se observar que houve estabilidade no valor da tensão superficial frente as variações de pH, temperatura e salinidade, já que as tensões permaneceram com valores em torno de 30 mN/m. Após quinze dias de experimento houve um aumento na tensão superficial e que com o decorrer do tempo esse valor voltou a reduzir. Com relação à variação de pH, os melhores valores de tensão superficial foram verificados em pH neutro (25 -30 mN/m).

Os resultados obtidos são comparáveis aos observados em estudos realizados por Nitschke *et al.* (2004), no qual micro-organismos foram selecionados para a produção de biossurfactantes utilizando resíduos agroindustriais como substratos, os valores de tensão superficial permaneceram em torno de 27 mN/m.

### 3.2. Determinação da Atividade de Emulsificação do Biossurfactante Frente à Adição de Sorbato de Potássio

A Figura 2 apresenta os percentuais de emulsificação de diferentes compostos hidrofóbicos pelo biossurfactante adicionado do conservante sorbato de potássio.

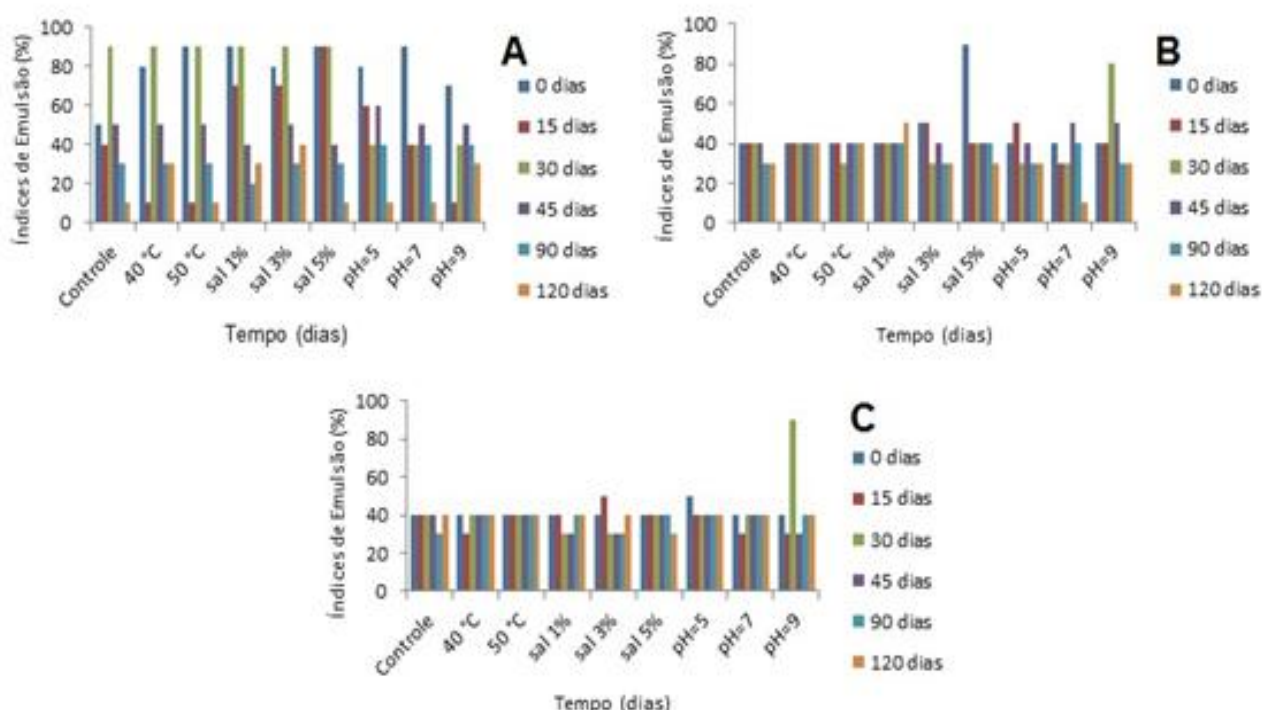


Figura 2 – Capacidade de emulsificação de óleo de motor (A), óleo de milho (B) e óleo de soja (C) pelo biossurfactante de *Candida lipolytica* adicionado de sorbato de potássio.

Os resultados observados para atividade de emulsificação do óleo de motor (Figura 2A) apresentaram valores satisfatórios, visto que valores de 50 a 90% foram observados para todos os parâmetros testados. Após trinta dias, uma maior atividade de emulsificação, com valores a partir de 90% foi observada. Quando os líquidos metabólicos contendo o

biossurfactante conservado com sorbato de potássio foram submetidos a temperaturas entre 40 e 50°C as atividades de emulsificação permaneceram estáveis com valores em torno de 90%.

As emulsões formadas com os óleos vegetais de milho e soja, ilustrados respectivamente na Figura 2 (B) e (C), apresentaram resultados inferiores em relação ao óleo de motor, com atividades de emulsificação em torno de 50%. No pH 9,0 observou-se um aumento nos percentuais de emulsificação desses óleos após trinta dias de experimento. Em seguida, esses valores diminuíram mantendo-se novamente na faixa de 50%. Os resultados apresentados são comparáveis aos observados por Brasileiro *et al.* (2013) onde valores de 25,9% foram obtidos para o óleo de soja e 100% para o óleo de motor.

### **3.3. Dispersão do Óleo de Motor pelo Biossurfactante Conservado com Sorbato de Potássio**

Os resultados de dispersão obtidos para o biossurfactante formulado com sorbato de potássio submetido a variações de temperatura, salinidade e pH em diferentes proporções de 1:2, 1:8, 1:25 (v/v) (surfactante/óleo de motor) durante 120 dias, estão ilustrados nas Figuras 3 (A), (B) e (C), respectivamente.

Os maiores percentuais de dispersão foram observados quando o biossurfactante foi aplicado na maior proporção em relação ao óleo, como pode ser verificado na Figura 3 (A) onde apresentou dispersões de até 45 %. Observou-se também, que o tempo de prateleira de 120 dias favoreceu a capacidade dispersante do biossurfactante, já que dispersões de 40 % foram observadas para as três diferentes concentrações testadas em todos os parâmetros analisados.

Considerando os inúmeros parâmetros avaliados, pode-se observar que a temperatura de 40°C favoreceu a dispersão do óleo de motor, possibilitando a utilização futura do biossurfactante em ambientes com temperaturas elevadas. A faixa neutra de pH também exerceu uma influência positiva, enquanto que a presença de elevadas concentrações salinas não foram favoráveis à propriedade dispersante do biossurfactante formulado.



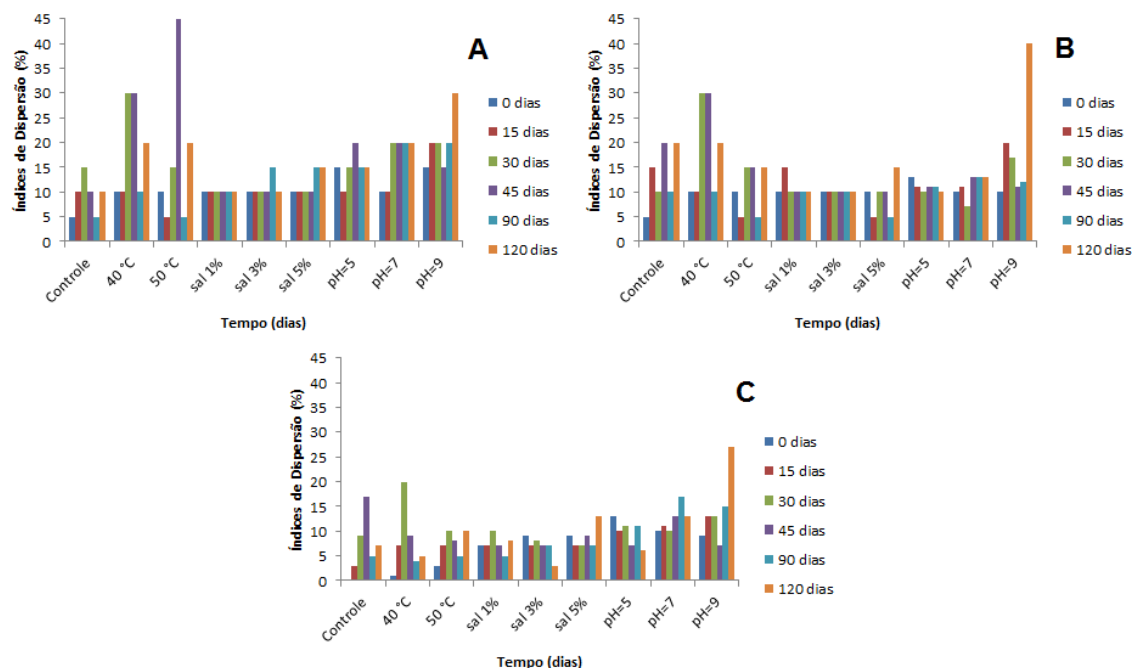


Figura 3 – Capacidade de dispersão do óleo de motor pelo biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* adicionado de sorbato de potássio na proporção 1:2 (A), 1:8 (B) e 1:25 (C).

## 5. CONCLUSÃO

O biossurfactante produzido pela *Candida lipolytica* e formulado com Sorbato de Potássio, apresentou a conservação de suas propriedades básicas como a capacidade de redução da tensão superficial e a emulsificação de óleo de motor. Dessa forma, pode-se sugerir seu potencial de utilizações futuras, como agente de remediação ambiental.

## 6. REFERÊNCIAS

- 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, V.A.; SARUBBO, L.A. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido em biorreator para biorremediação. In: *I Congresso Internacional de Ciências Biológicas, II Congresso Nacional de Ciências Biológicas e VI Simpósio de Ciências Biológicas*. 2013.
- CALVO, C.; MANZANERA, M.; CASTRO, G.A.S.; LOPEZ J.G. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Future prospects. Sci Total Environ* v. 407, p. 3634–3640, 2009.
- COIMBRA, C.D.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. *Curr. Microbiol.* 58, p. 245–251, 2009.
- FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; GIOVANNA MARTINOTTI, M., BANAT, I.M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – Present Status

- and Future Potentials, Biomedical Science, Engineering and Technology. *Dhanjoo N. Ghista* (Ed.), v. 14, p. 325-370, 2012.
- FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; SMYTH, T.J.P.; BANAT, I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*. v. 112, p. 27–617, 2010.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* v. 99, p. 195–199, 2008.
- LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; SARUBBO, L.A.; TAKAKI, G.G. C. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Int. J. Mol. Sci.* v. 84, p. 1-5, 2011.
- LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; TAKAKI, G.M.C. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, p. 202-209, 2013.
- PATTANATH, K. M.; RAHMAN, K. S.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants - review. *Biotechnology*, v. 7, p.360-370, 2008.
- RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; BENICIO, B.N.; TAKAKI, G.M.C. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 907–914, 2008.
- SAEKI, H.; SASAKI, K.M.; KOMATSU, O.; MIURA, A.; MATSUDA, H. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia sp* strain JE-1058. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 572-577, 2009.
- SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, v. 79, p. 174-183, 2010.
- TULEVA, B.K.; IVANOV, G.R.; CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.57, p. 356-360, 2002.