

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BIOSSURFACTANTE FORMULADO PRODUZIDO POR *CANDIDA SPHAERICA*

J. G. M. BRITO¹, P. F. CORRÊA¹, H. S. AMORIM¹, B.G. FREITAS¹, 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: julianagabriela_brito@outlook.com

RESUMO - O crescente interesse por biossurfactantes é atribuído às características como capacidade de redução da tensão superficial, emulsificação e baixa toxicidade. Neste sentido a *Candida sphaerica* foi cultivada em meio de 5% do resíduo de óleo vegetal e 2,5% de milhocina, durante 144 horas a 200 rpm para a produção de biossurfactante. O biossurfactante produzido foi submetido a um conservante comercial a fim de testar sua estabilidade frente a diferentes variações de pH, temperatura e sal. Após formulação do líquido metabólico contendo o biossurfactante produzido, foram estocadas à temperatura ambiente por 120 dias, onde foram realizados testes de tensão superficial, atividade de emulsificação e capacidade de dispersão. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante formulado, apresentou propriedades tensoativas, emulsificantes e dispersantes, em diferentes condições ambientais de pH, temperatura e de sal. Dessa forma a biomolécula apresenta potencial para aplicação industrial.

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos químicos constituídos por moléculas anfipáticas contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas que possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água (Fracchia *et al.*, 2012; Banat, 2010). Estas características permitem aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial e formar microemulsões onde os hidrocarbonetos possam se solubilizar em água ou onde a água possa se solubilizar em hidrocarbonetos (Ron; Rosenberg, 2002b). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Marchant; Banat, 2012b).

A Biotecnologia permitiu ampliar os limites de aplicação dos aditivos sintéticos, desenvolvendo novos produtos baseados na capacidade sintética dos micro-organismos. Estas perspectivas, relacionadas aos produtos de elevado interesse industrial, têm conduzido a investigação e o desenvolvimento de novas tecnologias na produção de agentes surfactantes por microrganismos (Stampfli; Nersten, 1995).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Reddy, 1995).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Muitos biossurfactantes

têm sido produzidos a partir de substratos agroindustriais, renováveis e de baixo custo. 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 (Gallert; Winter, 2002).

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). Outra condição essencial para o uso de biossurfactantes é que eles possam ser produzidos por micro-organismos não patogênicos.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi produzir um agente surfactante a partir de *Candida sphaerica* utilizando resíduos industriais como substratos de baixo custo, bem como formular o biossurfactante com vistas à aplicação dessa biomolécula como aditivo comercial coadjuvante dos processos de remediação de poluentes hidrofóbicos gerados na indústria de petróleo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

Candida sphaerica, mantida em meio YMA (Yeast Mold Ágar) foi utilizada como micro-organismo produtor do biossurfactante. Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

2.2. Meios de manutenção e crescimento do inóculo

A manutenção da levedura foi realizada utilizando-se o meio Yeast Mold Ágar (YMA), com a seguinte composição: extrato de levedura (0,3%), D-glicose (1%), triptona (0,5%), ágar (2%) Água destilada q.s.p (100mL). Os componentes foram solubilizados e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Quando excluído o ágar, constituiu o meio de crescimento, Yeast Mold Broth (YMB).

2.3. Meio de produção

As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas em meio formulado com água destilada contendo 5% do resíduo de óleo vegetal e 2,5% de milhocina. Após o preparo dos meios, o pH será ajustado para 5,3 com auxílio de uma solução 5,0 M de NaOH e estes serão autoclavados a 121°C por 20 minutos.

2.4. Preparação do inóculo

O inóculo 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 YMB e incubados sob agitação de 200 rpm a 27°C durante 24 horas.

2.5. Produção do biossurfactante

As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas 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 27°C.

2.6. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi medida no líquido metabólico livre de células em tensiômetro KSV Sigma 70 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY.

2.7. Estabilização do líquido metabólico com propriedade surfactante

O líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante produzido foi conservado de acordo com o seguinte procedimento: (1) ao líquido metabólico foi adicionada a concentração de 0,2 % sorbato de potássio. Em seguida, o líquido metabólico tratado conforme o procedimento descrito acima foi estocado à temperatura ambiente ao longo de 120 dias para observação da estabilidade. Testes foram realizados para determinação do tempo de estocagem (0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias) à temperatura ambiente de 28-30°C, verificando-se a tensão superficial, capacidade de emulsificação e dispersão de composto hidrofóbico em água do mar, conforme descrito abaixo.

2.8. Determinação da atividade de emulsificação

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

2.9. Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeitos do pH, da adição de NaCl, sob aquecimento)

Os efeitos de diferentes temperaturas (40 e 50°C), de diferentes concentrações de NaCl (1, 3 e 5 %) e de diferentes pHs (5, 7 e 9) na atividade do biossurfactante foram avaliados no líquido metabólico livre de células para determinação da tensão superficial e da atividade de emulsificação.

2.10. Experimentos de deslocamento (dispersão) de composto hidrofóbico em água do mar

A capacidade de dispersão de manchas de derivados de petróleo foi simulada em laboratório contaminando-se amostras de água do mar com óleo de motor. Os testes foram conduzidos pela adição do líquido metabólico livre de células e da solução do biossurfactante ($\frac{1}{2}$ CMC, CMC) 10µL em 15µL do óleo motor. Os resultados foram observados visualmente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido relacionada à tensão superficial

A redução da tensão superficial ou interfacial é considerada um dos principais parâmetros para detecção de um composto tensoativo em um determinado meio (Luna *et al.*, 2013).

O líquido metabólico contendo o biossurfactante produzido por *C. sphaerica* apresentou uma tensão superficial praticamente estável, ao se adicionar o conservante a uma concentração de 0,2% de sorbato, apresentando valores de tensão superficial 25 mN/m quando submetido à diferentes variações de pH, temperatura e NaCl (Figura 1).

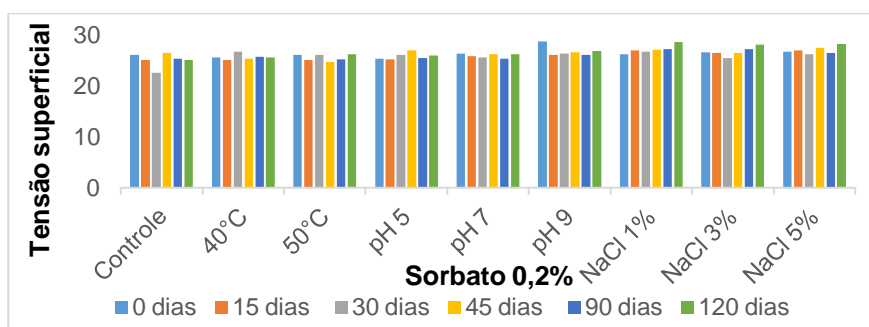


Figura 1- Tensões superficiais do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* sob conservação com adição de sorbato de potássio a 0,2% durante 120 em diferentes condições: temperatura (40 e 50°C); pH (5, 7 e 9) e salinidade (1, 3 e 5%).

3.2. Estabilidade do biossurfactante relacionada à capacidade de emulsão

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida encontra-se dispersa como gotas microscópicas em uma outra fase líquida contínua (Desai; Banat, 1997). Quando um líquido é disperso em outro, as pequenas gotas formadas promovem uma grande quantidade de área interfacial e superficial. Na presença de surfactantes, as emulsões formadas podem permanecer estáveis através da redução da tensão interfacial e da redução do grau de coalescência. A estabilidade de uma emulsão está relacionada, assim, ao comportamento do equilíbrio da fase óleo/água/surfactante formada pela ação deste último (Urum; Pekdemir, 2004).

O índice de emulsificação do biossurfactante produzido por *C. sphaerica* contendo 0,2% de conservante foi determinada para vários substratos imiscíveis em água: óleo motor, óleo de milho e óleo de soja.

Nos testes para determinação do índice de emulsificação foi observado que os melhores percentuais de emulsificação foram obtidos para o óleo de motor, em torno de 80% (Figura 2). Quando o biossurfactante conservado foi submetido a variações de pH, houve uma redução no índice de emulsificação nos pHs 7 e 9, enquanto que no pH 5 foi observada uma redução no índice de emulsificação no quadragésimo quinto dia de experimento. Para as concentrações de NaCl e variações de temperaturas (Figura 2), observou-se que o biossurfactante permaneceu praticamente estável.

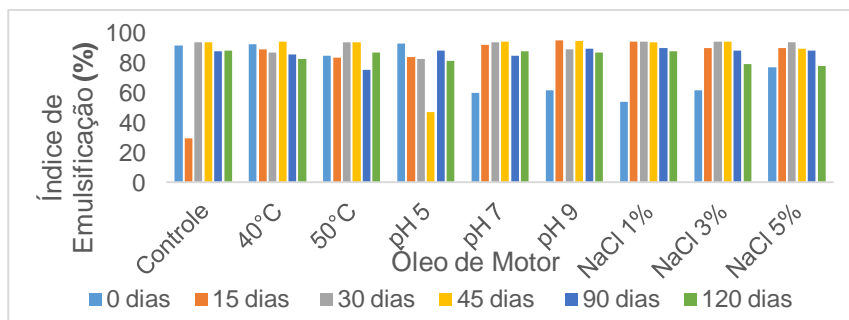


Figura 2 - Índice de emulsificação do biossurfactante produzido contendo sorbato de potássio a 0,2% utilizando óleo de motor variando: pH, NaCl e temperatura.

Quando o líquido metabólico foi submetido a variações de pH (Figura 3), observou-se que houve uma diminuição no índice de emulsificação nos pHs 5 e 7, enquanto que no pH 9 foram observados os melhores percentuais de emulsificação.

Para as concentrações de NaCl, observou-se que os melhores percentuais de emulsificação para o óleo de soja foi no decimo quinto dia de experimento, independente da concentração de NaCl (Figura 3), enquanto que para a variação da temperatura foi observada uma redução na estabilidade da emulsificação na temperatura de 50 °C (Figura 3).

Esses resultados sugerem que a atividade de emulsificação depende da afinidade do biossurfactante com os substratos hidrocarbonados, que envolve a interação direta com o próprio hidrocarboneto, do que da tensão superficial do meio (Luna *et al.*, 2013).

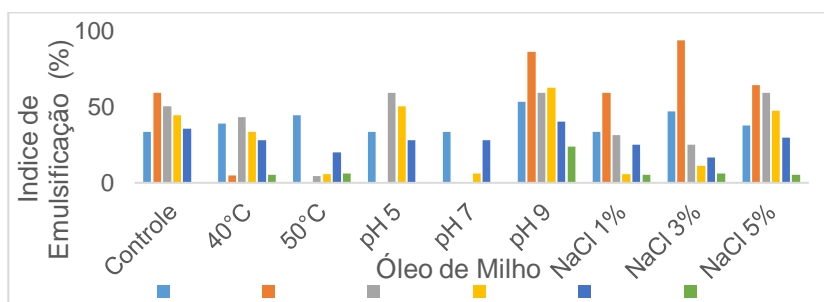


Figura 3 – Índice de emulsificação do biossurfactante produzido contendo sorbato de potássio a 0,2% utilizando óleo de milho variando: pH, NaCl e temperatura

Quando o líquido metabólico foi submetido a variações de pH (Figura 3), observou-se que os melhores percentuais de emulsificação foram obtidos em pH 9.

Para as concentrações de NaCl, observou-se que o biossurfactante não apresentou emulsificação para o óleo de milho no decimo quinto dia de experimento quando adicionou-se 1% de NaCl. Já na concentração de 3% de NaCl, houve uma redução no índice de emulsificação no quadragésimo quinto dia de experimento quando comparado ao controle. Para a condição contendo 5% de NaCl o biossurfactante apresentou o melhor percentual de emulsificação de 47,06% no trigésimo dia de experimento (Figura 3).

Com relação a variação da temperatura, foi observada uma redução na emulsificação para óleo de soja no quadragésimo quinto dia de experimento para as temperaturas de 40 e 50 °C, quando comparado ao controle.

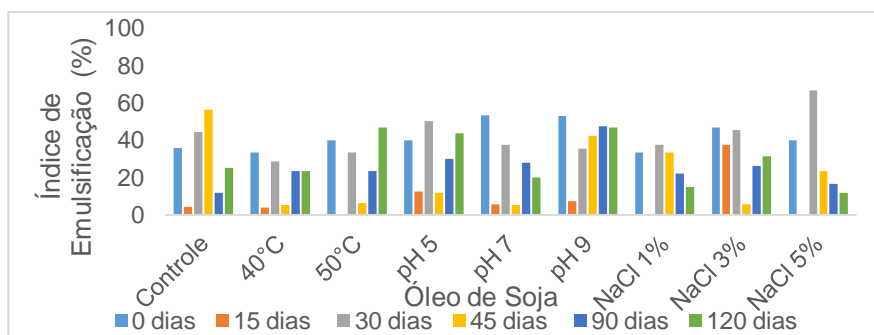


Figura 4 –Índice de emulsificação do biossurfactante produzido contendo sorbato de potássio a 0,2% utilizando óleo de soja variando: pH, NaCl e temperatura.

3.3. Estabilidade do biossurfactante relacionada à dispersão de óleo em água do mar

Outra importante característica dos biossurfactantes é a atividade de dispersão, que é o processo no qual o hidrocarboneto é disperso na fase aquosa como gotas emulsificadas muito pequenas. As emulsões não são estáveis termodinamicamente. Contudo, elas podem permanecer estáveis por períodos significantes de tempo em função de restrições cinéticas. A dispersão está relacionada à tensão interfacial e à concentração do surfactante e difere do deslocamento uma vez que o processo de deslocamento está relacionado apenas à tensão interfacial entre as fases aquosa e hidrofóbica, sem a formação de emulsões (Bai *et al.*, 1997).

As Figuras 5, 6 e 7 ilustram a capacidade do biossurfactante de *C. sphaerica* em dispersar o óleo de motor quando utilizado em diferentes proporções em relação ao óleo derramado (1:2; 1:8 e 1:25 vol/vol biossurfactante bruto:óleo), sob influência da variação do pH, da temperatura e na presença de NaCl.

Na Figura 5 observou-se que a variação do pH não alterou o desempenho do líquido metabólico em relação aos índices de dispersão alcançados quando comparados ao controle e o melhor percentual de dispersão foi obtido no trigésimo dia de experimento.

Em relação aos testes com adição de NaCl, os resultados demonstraram que o percentual de dispersão permaneceu praticamente estável. Com relação à variação da temperatura, observou-se que o biossurfactante formulado permaneceu estável (Figura 5).

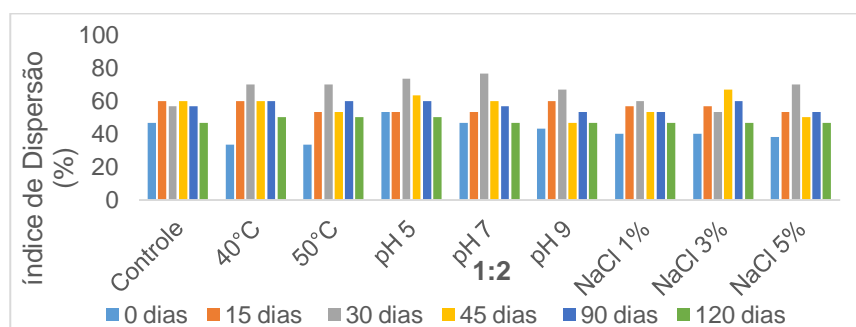


Figura 5 – Índice de dispersão do biossurfactante utilizando de óleo motor na proporção de 1:2 (vol/vol) em relação às variações de pH, NaCl e temperatura.

Pode-se observar que o biossurfactante testado não apresentou uma redução na sua atividade dispersante quando comparado com o controle em todas as variações testadas. Os maiores valores de dispersão foram observados no trigésimo dia de experimento (Figura 6).

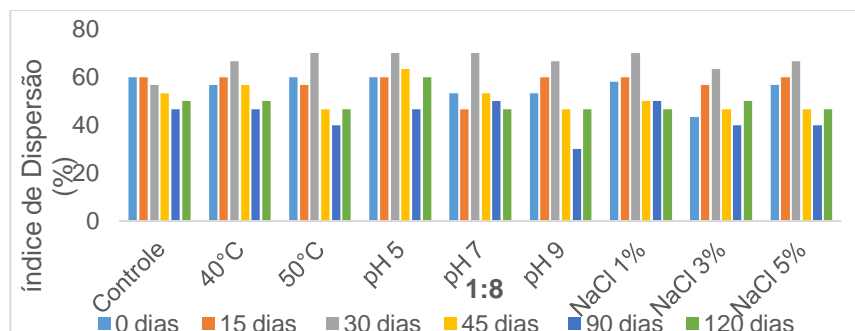


Figura 6 – Índice de dispersão do biossurfactante utilizando de óleo motor na proporção de 1:8 (vol/vol) em relação às variações de pH, NaCl e temperatura.

Observou-se que houve uma redução na atividade dispersante do líquido metabólico contendo 0,2% de sorbato de potássio quando submetido às variações de pH 7 e 9 no nonagésimo dia do experimento (Figura 7).

Com relação à variação da concentração de NaCl, foi observado que a atividade dispersante permaneceu praticamente estável (Figura 7).

O líquido metabólico contendo 0,2% de sorbato foi submetido à variação da temperatura, onde se pode observar que houve uma redução na atividade de dispersão na temperatura de 50°C quando comparado ao controle.

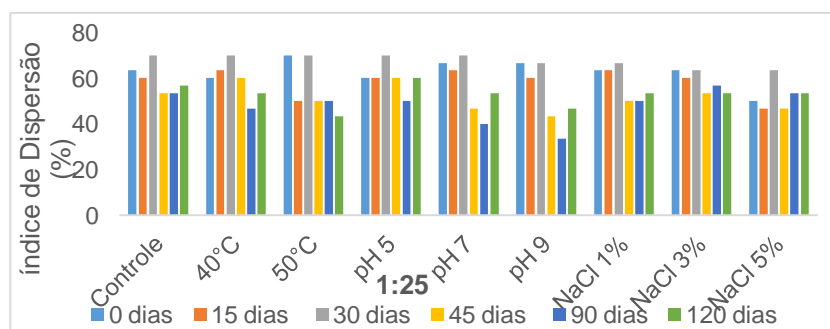


Figura 7 – Índice de dispersão do biossurfactante utilizando de óleo motor na proporção de 1:25 (vol/vol) em relação às variações de pH, NaCl e temperatura.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

- BAI, G.; BRUSSEAU, M.L.; MILLER R.M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *J. contam. Hydrol.*, v. 25, p.157-170, 1997.
- BANAT, I M. Microbial biosurfactants production, applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 87, p.427-444, 2010.
- DESAI, I. M.; BANAT. Microbiology Molecular Biology. *Rev.*, v.61, p. 47-64, 1997.
- 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, Editora Dhanjoo N. Ghista p. 325-370, 2012.
- GALLERT, C. WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Naturwissenschaften.*, v. 89, p. 483-496, 2002.
- 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.
- MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol.*, v. 11, p. 558-565, 2012b.
- 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.
- REDDY, C. A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Environ. Biotechnol.*, v. 6, p. 320-328, 1995.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Z. Naturforsch.*, v. 3, p. 229-236, 2002b.
- STAMPFLI, L.; NERSTEN, B. Emulsifiers in bread making. *Food Chemistry.*, v. 52, p. 353-360, 1995.
- URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ROSS, D. et al. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere.*, v.9, p. 1139-1150, 2004.