

Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar

Juliana Moura de Luna

Graduada em Biologia, Mestre em Ciências Biológicas e
Doutoranda em Ciências Biológicas – UFPE;
Centro de Ciências e Tecnologia, Núcleo de Pesquisas em
Ciências Ambientais – NPCIAMB – Unicap.
Recife – Pernambuco [Brasil]
juliana_mouraluna@yahoo.com.br

Raquel Diniz Rufino

Graduada em Biologia, Mestre em Biologia de Fungos e
Doutoranda em Biologia de Fungos – UFPE;
Centro de Ciências e Tecnologia, Núcleo de Pesquisas em
Ciências Ambientais – NPCIAMB – Unicap.
Recife – Pernambuco [Brasil]
raqueldrufino@yahoo.com.br

Leonie Asfora Sarubbo

Doutora em Engenharia Química – Unicamp;
Professora do Centro de Ciências e Tecnologia, Cursos de
Engenharia Química e Engenharia Ambiental;
Assessora da Coordenação Geral de Pesquisa – Unicap .
Recife – Pernambuco [Brasil]
leonie@unicap.br

Galba Maria de Campos-Takaki

Doutora em Microbiologia e Imunologia – USP;
Professora do Centro de Ciências e Tecnologia, Cursos de
Engenharia Química e Engenharia Ambiental; Coordenadora
do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais;
Coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento
de Processos Ambientais – Unicap.
Recife – Pernambuco [Brasil]
takaki@unicap.br

O desenvolvimento de surfactantes biodegradáveis e menos tóxicos, como os microbianos, torna-se uma estratégia importante na obtenção de compostos compatíveis com o meio ambiente. Neste trabalho, a produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica* foi estudada, utilizando-se um planejamento fatorial, para avaliar a influência dos componentes do meio: resíduo de refinaria de óleo vegetal, milhocina e água do mar na redução da tensão superficial. Menores valores de tensão (27 mN m^{-1}) foram obtidos no ponto central do planejamento (meio contendo 4% do resíduo, 4% de milhocina com 50% de água do mar). A cinética de crescimento do microrganismo demonstrou que a fase estacionária foi atingida nas primeiras 48 horas de cultivo. Os maiores índices de emulsificação foram observados em óleos de motor, milho e de algodão. Testes de estabilidade das emulsões, formadas sob diferentes temperaturas e na presença de NaCl, revelaram poucas variações sob condições ambientais específicas, indicando o potencial de utilização do surfactante no meio ambiente e em diferentes indústrias. Os resultados indicam a viabilidade de produção de biossurfactantes potentes a partir de meio de baixo custo formulado com água do mar.

Palavras-chave: Biossurfactantes. *Candida sphaerica*. Resíduos industriais.



1 Introdução

A poluição ambiental provocada por óleos e derivados de petróleo é um problema que atinge proporções mundiais e, a cada ano, aumenta drasticamente (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Um dos problemas associados à biodegradação de compostos hidrofóbicos, que incluem os hidrocarbonetos do petróleo, é sua ligação às partículas do solo e à pouca solubilidade de água que resulta em baixa biodisponibilidade para os microrganismos, o que pode retardar ou mesmo paralisar esse processo. Um dos procedimentos mais investigados para a resolução desse problema consiste na utilização de compostos surfactantes (VAN HAMME et al., 2006; COIMBRA et al., 2009).

A maioria dos surfactantes disponíveis é derivada do petróleo. Entretanto, a nova legislação de proteção ao meio ambiente bem como a proteção ambiental têm levado os consumidores a buscar os surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (SARUBBO et al., 2006; RUFINO et al., 2007).

Nesse contexto, destacam-se os produtos metabólicos de vários microrganismos, os chamados biosurfactantes – compostos anfipáticos constituídos de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica – produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água, como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, por meio da produção de agentes surfactantes que auxiliam a disponibilizar esses compostos à célula microbiana, por meio das emulsões formadas (LUNA et al., 2008). A porção polar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a apolar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (SINGH et al.,

2007; MARÍN, 1996). Em razão da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a distribuir-se nas interfaces entre fases fluidas, com diferentes graus de polaridade óleo/água e água/óleo (DESAI, 1997; PEKDEMIR, 2004).

A produção mundial de óleos e gorduras – 75% derivados de plantas – é de 2,5 a 3 milhões/ano, sendo a maioria usada na indústria alimentícia, responsável por grandes quantidades de resíduos graxos de extração das sementes oleaginosas. O acúmulo desses resíduos tem aumentado a utilização desses materiais para a transformação microbiana (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Nesse sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de produzir agentes surfactantes de *Candida sphaerica*, utilizando meio de baixo custo para aplicá-lo como coadjuvante na redução da poluição ambiental provocada por compostos hidrofóbicos.

2 Materiais e métodos

A *Candida sphaerica* (UCP 995), levedura isolada do solo contaminado por chumbo do município de Belo Jardim (BRANDÃO, 2001) e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, foi utilizada como microrganismo produtor de biosurfactante. A cultura foi mantida a 5°C no meio Yeast Mold Agar (YMA), com a seguinte composição (p/v): extrato de levedura (0.3%), extrato de malte (0.3%), triptona (0.5%), D-glicose (1%) e ágar (5%). Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

Dois resíduos industriais foram utilizados como substratos para a produção do biosurfactante: resíduo da refinaria de óleo vegetal de soja, gentilmente cedido pela ASA Ltda., Recife-PE,

como substrato insolúvel, e a milhocina, subproduto da fabricação do milho, gentilmente cedida pela Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, como solúvel.

A produção do biossurfactante foi realizada, utilizando-se o meio Yeast Salt Water (YSW), inicialmente descrito por Vance-Harrop (2000). O meio base foi constituído por 1,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,04% de K_3PO_4 ; 0,4% de uréia; 50% de água do mar e 50% de água destilada, pH 5,0. Os substratos resíduo industrial e milhocina foram adicionados ao meio, de acordo com um planejamento experimental.

Inicialmente, realizou-se um planejamento fatorial completo 2^3 com 4 pontos centrais, com o objetivo de analisar os efeitos principais e interações das concentrações variáveis do resíduo industrial, milhocina e água do mar, sobre a variável resposta tensão superficial. A matriz do planejamento codificada (Tabela 1) e os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central encontram-se especificados na Tabela 2. A análise dos resultados foi feita por meio do programa STATISTIC, versão 6.0 da Statsoft, USA.

As fermentações para a produção do biossurfactante foram realizadas em frascos de Erlenmeyer, com 500 ml de capacidade contendo 100 ml do meio de produção, incubados com 1 % da suspensão celular contendo 10^5 células ml^{-1} . Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, durante 144 horas, à temperatura de 27°C. Coletaram-se alíquotas de 4 mL, em duplicata, de 6 em 6 horas, nas primeiras 24 horas de cultivo e, em seguida, a cada 24 horas até o período de 144 horas, sendo posteriormente utilizadas para atender às seguintes determinações: cinética de crescimento, determinação do pH e índice de emulsificação.

Para determinar a atividade de emulsificação, as amostras foram centrifugadas a 2000 g, durante 20 minutos e, em seguida, analisadas segundo

Tabela 1: Valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central

NÍVEL	Resíduo industrial (%)	Milhocina (%)	Água do mar/Água destilada (v/v)
-1	2	2	1:2
0	4	4	1:1
+1	6	6	2:1

Fonte: Os autores.

Tabela 2: Valores das variáveis independentes do planejamento fatorial nos níveis -1, +1 e no ponto central. Variável resposta: tensão superficial após 144 horas de cultivo

Condições	Resíduo industrial	Milhocina	Água do mar	Tensão superficial (mN/m)
1	-1	-1	-1	37,86
2	+1	-1	-1	35,12
3	-1	+1	-1	41,02
4	+1	+1	-1	32,35
5	-1	-1	+1	36,18
6	+1	-1	+1	44,15
7	-1	+1	+1	47,30
8	+1	+1	+1	39,52
9	0	0	0	27,00
9	0	0	0	27,01
9	0	0	0	27,10
9	0	0	0	27,12

As variáveis utilizadas foram codificadas com os seguintes valores: Resíduo industrial, 2% (-1) e 6% (+1); milhocina, 2% (-1) e 6% (+1); água do mar e água destilada 1:2 (-1) e 2:1 (+1). Os valores dos pontos centrais foram: Resíduo industrial, 4%; milhocina 4%; água do mar e água destilada 1:1.
Fonte: Os autores.

a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987), em que 1,0 ml de um hidrocarboneto (óleo de motor, óleo de milho, óleo de algodão e diesel) foi adicionado a 1,0 ml do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação em tubos graduados e agitados em vortex, durante um minuto. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas, e o índice de emulsificação (E), calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor multiplicado por 100. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



A estabilidade do biossurfactante produzido na condição selecionada a partir do planejamento fatorial foi avaliada pela determinação do índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células ante diferentes temperaturas (5, 25 e 100°C), por 10 minutos, e diferentes concentrações de NaCl (2,5, 5 e 10%). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A tensão superficial foi medida de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina et al. (2005), em tensiômetro automático (Modelo Sigma 70, KSV Ltd., Finland), utilizando o anel de NUOY.

3 Resultados e discussão

A redução da tensão superficial é utilizada como um critério primário para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade em reduzir a tensão superficial (YOUSSEF, 2004; SHEHEPHERD et al., 1995).

Nesse sentido, os ensaios realizados para a produção do agente surfactante por *C. sphaerica* foram avaliados com o auxílio de um planejamento fatorial completo de 2^3 , com 4 repetições no ponto central, para analisar os principais efeitos e interações das variáveis: concentração do resíduo industrial, milhocina e água do mar, sobre a variável resposta tensão superficial.

Os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa não-convencional ao fornecimento de substratos de baixo custo à produção de biossurfactantes. Resíduos de destilaria (DUBEY; JUWARKAR, 2001), soro de queijo (KOCH et al., 1991), melaço (PATEL; DESAI, 1997) e efluente de óleo de oliva (MERCADÈ et al., 1993), entre outros, têm sido descritos como substratos importantes para a produção desses compostos de origem microbiana.

Os resultados obtidos demonstraram que a redução da tensão superficial foi observada na condição do ponto central contendo 4% do resíduo industrial, 4% da milhocina, 50% água destilada e 50% água do mar, uma vez que a tensão superficial da água foi reduzida de 70 mN m^{-1} para 27 mN m^{-1} . O biossurfactante de *C. sphaerica* mostrou maior capacidade em reduzir a tensão do que os surfactantes produzidos por *C. lipolytica* (32 mN m^{-1}) (RUFINO et al., 2007), *C. glabrata* (31 mN m^{-1}) (SARUBBO et al., 2006), *C. antarctica* (35 mN m^{-1}) (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000) e *Yarrowia lipolytica* (50 mN m^{-1}) (AMARAL et al., 2006). Para Mulligan (2005), o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* atuou na redução da tensão superficial do meio de cultivo para 27 mN/m .

A Figura 1 mostra a cinética de crescimento do microrganismo de *C. sphaerica* cultivada em meio formulado com 50% de água destilada e 50% de água do mar contendo 4,0 % de resíduo de refinaria e 4,0 % de milhocina. A cinética demonstrou um perfil diaúxico, em que a fase estacionária foi atingida nas primeiras 48 horas de cultivo. O pH aumentou nas primeiras 24 horas e, a partir desse ponto, permaneceu praticamente estável até o final da fermentação. Sarubbo et al. (2006) também identificaram que as cinéticas de crescimento da *C. glabrata* demonstraram um perfil diaúxico, enquanto Rufino (2006) verificou que o início da fase exponencial de crescimento de *C. lipolytica* UCP0988 foi observado com 4 horas de cultivo, prolongando-se até as 40 horas de fermentação. A presença de glicose nos cultivos foi um fator determinante na acidez do meio, pois em sua presença houve uma redução no pH que atingiu valores estáveis em torno de 3,0, no início da fase estacionária de crescimento.

Os maiores índices de emulsificação foram obtidos com óleo motor, de milho e de algodão, respectivamente (Figura 2). Esses resultados sugerem que a atividade de emulsificação depende

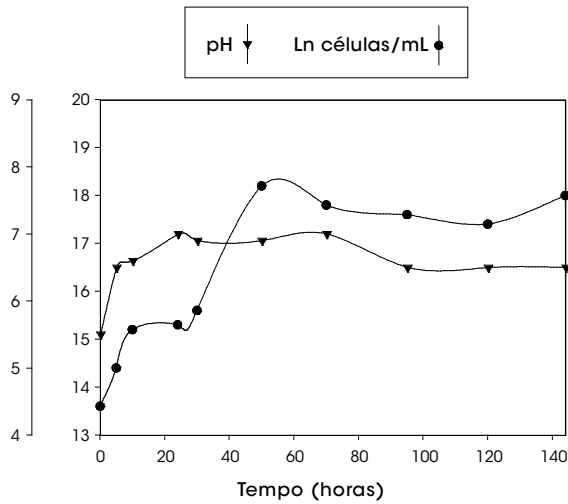


Figura 1: Cinética de crescimento e pH de *Candida sphaerica* durante o cultivo em meio contendo 4% de resíduo industrial e 4% de milhocina em água destilada e água do mar (1:1, v/v)

Fonte: Os autores.

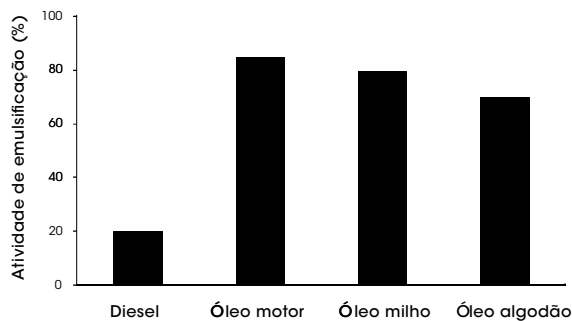


Figura 2: Capacidade de emulsificação de diferentes substratos oleosos do biossurfactante de *Candida sphaerica* cultivada em meio contendo 4% de resíduo industrial e 4% de milhocina em água destilada e água do mar (1:1, v/v)

Fonte: Os autores.

mais da afinidade com os substratos hidrocarbonados, que envolve a interação direta com o próprio hidrocarboneto, do que da tensão superficial do meio. Resultados similares foram obtidos com *Rhodococcus* cultivada em hidrocarbonetos (ABU-RUWAIDA et al., 1991). Brown e colaboradores (1985) conseguiram resultados semelhantes com o índice de emulsificação do óleo de motor e o óleo de milho, com valores de 78% e 70%, respectivamente,

te, usando líquido metabólico produzido por uma bactéria aeróbia não identificada, denominada de isolado 1165. Estudos demonstraram que a atividade emulsificante depende da afinidade do biossurfactante com o substrato testado (THANOMSUB et al., 2004; URUM; PEKDEMIR, 2004). É importante ressaltar que o biossurfactante produzido nas condições estabelecidas neste trabalho demonstra aplicabilidade como agente surfactante, além de poder atuar como emulsificante.

Fatores ambientais como salinidade e temperatura influenciam na atividade e na estabilidade de um biossurfactante. Conseqüentemente, é de fundamental importância o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicações específicas para esses compostos (MULLIGAN, 2005).

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de células, após 144 horas de cultivo, quando submetido a diferentes temperaturas e concentrações crescentes de NaCl, em razão do índice de emulsificação.

A Figura 3 mostra a estabilidade das emulsões do biossurfactante ante diferentes temperaturas (5°, 28° e 100°C), demonstrando que sua capacidade de emulsificação não foi alterada quando submetido a diferentes temperaturas. Esses resultados são semelhantes aos observados por Abu-Ruwaida et al. (1991), que descreveram emulsões obtidas de um isolado bacteriano. Além dos testes de temperatura, a estabilidade das emulsões do surfactante ante diferentes concentrações de NaCl também foi avaliada. Como mostra a Figura 4, observou-se que o surfactante emulsificou bem os substratos testados, independentemente da concentração de NaCl a que foi submetido. Esses resultados estão de acordo com achados da literatura que relatam a estabilidade dos biossurfactantes a concentrações de 10% de NaCl, enquanto concentrações salinas de 2% a 3% são suficientes para inativar surfactantes convencionais.

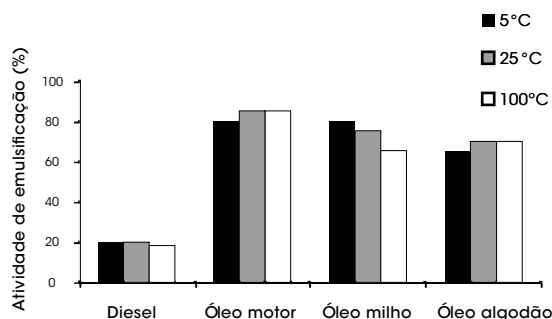


Figura 3: Estabilidade das emulsões do biosurfactante contido no líquido metabólico livre de células de *Candida sphaerica* cultivada em meio contendo 4% de resíduo industrial e 4% de milhocina em água destilada e água do mar (1:1, v/v), utilizando diferentes substratos oleosos e submetidas a diferentes temperaturas

Fonte: Os autores.

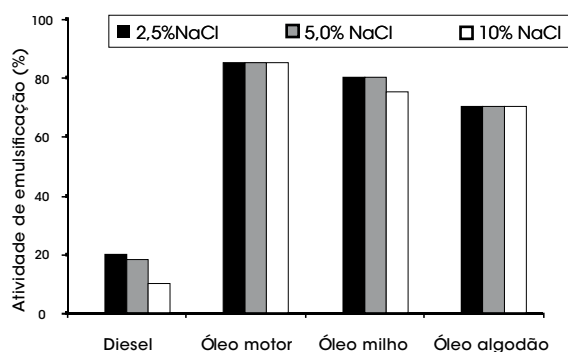


Figura 4: Estabilidade das emulsões do biosurfactante contido no líquido metabólico livre de células de *Candida sphaerica* cultivada em meio contendo 4% de resíduo industrial e 4% de milhocina em água destilada e água do mar (1:1, v/v), utilizando diferentes substratos oleosos e submetidas a diferentes concentrações de sal

Fonte: Os autores.

4 Considerações finais

Os resultados obtidos demonstram a capacidade do microrganismo em se desenvolver em meio de baixo custo, formulado com água do mar, e em produzir um agente surfactante com capacidade tensoativa e emulsificante, motivando estudos futuros de aplicação do surfactante na remoção de poluentes hidrofóbicos da água e do solo.

Biosurfactant production in low-cost medium formulated with sea water

The development of biodegradable and low toxicity surfactants, as the biosurfactants obtained by microbiological synthesis, is becoming a strategy in obtaining more compatible components with the environment. In this work, the production of biosurfactants by *Candida sphaerica* was studied using a factorial design. The influence of the following culture medium components, named vegetal oil refinery residue, corn steep liquor and sea water on the surface tension reduction was evaluated. The best surface tension (27 mN m⁻¹) was found in the central point of the experimental design (medium formulated with 4% refinery residue, 4% corn steep liquor and 50% of sea water). The growth kinetics demonstrated that the stationary phase was reached in the first 48 hours of cultivation. Higher emulsification indexes had been observed with motor oil, corn oil and cotton oil. Stability tests of the emulsions submitted to different temperatures and in the presence of NaCl revealed few variations under the specific environmental conditions studied, showing great potential of the surfactant to be used for environmental and industrial applications. The promising results obtained indicate the viability of powerful biosurfactants produced from low-cost medium based on sea water.

Key words: Biosurfactants. *Candida sphaerica*. Industrial residues.

Referências

- ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria - Product characterization and evaluation. *Acta Biotechnologica*, v. 4, p. 315-324, 1991.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 313-316, 2000.

- AMARAL, P. F. F.; SILVA, J. M.da.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A. M. V.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M.; COUTINHO, J. A. P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1894-1898, 2006.
- BRANDÃO, L.V.C. *Produção de biossurfactantes por leveduras do gênero Candida, isoladas de solo de mata e solo poluído com chumbo*. 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied Environmental Microbiology*, v. 53, p. 224-229, 1987.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial, *Microbiology and molecular Biology reviews*, v. 61, p. 47-64, 1997.
- DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 61-69, 2001.
- KOCH, A. K.; KAPPEL, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 4212-4219, 1991.
- KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; MAKAROV, S. O.; LITVINENKO, L. V.; CUNNINGHAM, C. J.; PHILIP, J. C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environment International*, v. 31, p. 155-161, 2005.
- LUNA, J.M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. In press. 2008.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, p. 428-434, 2002.
- MARÍN, M.; PEDREGOSA, A.; RIOS, S.; LABORDA, F. *International Biodeterioration & Biodegradation*, p. 69-75, 1996.
- MULLIGAN, C. N. Everinmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p.183-198, 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.
- PATEL, R. M. ; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters Applied Microbiology*, v. 25, p. 91-94, 1997.
- PEKDEMIR, T.; ISHIGAMI, Y.; UCHIYAMA, H. Characterisation of aescin as a biosurfactant for environmental remediation. *J. Surfactants Detergents*, v. 2, p. 337-341, 1999.
- RUFINO, R. D. *Produção de biossurfactante por Candida lipolytica*. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos)- Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.
- _____; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal. Microbiology Biotechnology*, v. 23, p. 734 -741, 2007.
- SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Eletronic Journal Biotechnology*, v. 9, p. 400-406, 2006.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnoogy Advances*, v. 25, p. 99-121, 2007.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.W. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, p. 604-620, 2006.
- VANCE-HARROP, M. H. *Influência das fontes de carbono D-glicose e óleo de babaçu no crescimento de Candida lipolytica e na produção de biossurfactantes*. 2000. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos)- Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2000.

Recebido em 11 out. 2008 / aprovado em 13 dez. 2008

Para referenciar este texto

LUNA, J. M. de et al. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. *Exacta*, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 209-215, jul./dez. 2008.

