

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
DOUTORADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

**PRODUÇÃO OTIMIZADA DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN
POR *CANDIDA LIPOLYTICA* E APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS**

RAQUEL DINIZ RUFINO

RECIFE

2010

RAQUEL DINIZ RUFINO

**PRODUÇÃO OTIMIZADA DO BIOSURFACTANTE RUFISAN
POR *CANDIDA LIPOLYTICA* E APLICAÇÕES
BIOTECNOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, nível Doutorado, do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki

Co-orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

RECIFE

2010

Rufino, Raquel Diniz

Produção otimizada do Biossurfactante Rufisan por *Candida lipolytica* e aplicações biotecnológicas / Raquel Diniz Rufino. – Recife: O Autor, 2010.

159 folhas : ll., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Compostos orgânicos 2. Biotecnologia – Indústria 3. Fungos I. Título.

668.1

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 073

COMISSÃO EXAMINADORA

Galba Maria de Campos Takaki

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Recife-PE

Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Profa. Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG

Celuta Sales Alviano

Profa. Dra. Celuta Sales Alviano
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro-RJ

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE

Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti

Profa. Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE

“Em ti, pois, confiam os que conhecem o teu nome, porque tu, SENHOR, não desamparas os que te buscam.” (Salmos 9:10)

Dedico,

Ao maior responsável por essa vitória – Deus.

**Aos meus pais, Renivaldo e
Cosma pelo dom do amor
incondicional.**

**Ao meu amado esposo,
Petrusk, pelo amor na sua
forma mais sublime.**

**Ao meu amado irmão, Joran,
pelo carinho e cumplicidade
em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Galba Takaki, pelo exemplo de profissionalismo e pela oportunidade de contar com seu apoio desde a iniciação científica, e poder concluir mais esse passo.

À Profa. Dra. Leonie Sarubbo, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Por sua amizade, carinho, apoio e confiança desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. José Antônio Teixeira e à Profa. Dra. Lígia Rodrigues pelo apoio na realização do doutorado sanduíche, na Universidade do Minho, Portugal.

Ao Prof. Dr. Sílvio Romero de Melo Ferreira e a Giullian Rodrigues, pelos ensinamentos e colaboração.

A toda minha querida Família, que apesar da distância me encham de alegria e amor.

A querida família Campos Marinho, pelo carinho e afeto com que sempre me prestigiaram.

Ao querido amigo Charles Bronzo Barbosa Farias pelo carinho e amizade. E a Juliana Moura de Luna, companheira de muitos estudos e aventuras.

Às amigas: Aline, Camila, Camila Coimbra, Carolina Arruda, Daniele Khadydja, Ranielly e Selma pela mão amiga sempre que precisei.

A todos os amigos e professores do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB).

Aos Professores do Departamento de Micologia, em especial às

professoras Leonor Costa Maia e Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti.

Aos queridos Sônia Maria de Souza, Sr. Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana (in *memoriam*), André Felipe dos Santos, Francisco José de Santana e Francisco das Chagas Souza dos Santos pelo apoio e presteza em seus trabalhos.

Aos amigos e colegas da turma do Doutorado.

A Giovana e Adenilda, pela atenção e carinho que sempre me dispensaram.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, S.J. pelo acesso e utilização das instalações do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais.

À CAPES e FACEPE pela concessão da Bolsa de Doutorado e ao CNPq e FINEP pelo suporte financeiro na execução deste trabalho.

À CAPES pela concessão da Bolsa de Doutorado Sanduíche, realizado na Universidade do Minho, Portugal.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo Geral	22
2.2. Objetivos Específicos	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Biossurfactantes: considerações gerais	23
3.2. Propriedades dos biossurfactantes	24
<i>Tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)</i>	25
3.3. Microrganismos Produtores	27
<i>3.3.1. Produção de biossurfactantes por leveduras do gênero Candida</i>	29
3.4. Biossíntese dos biossurfactantes	31
3.5. Função fisiológica dos biossurfactantes	31
3.6. Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes	32
3.7. Aplicações dos biossurfactantes	36

3.7.1. Biorremediação	37
3.7.2. Limpeza de reservatórios de óleos	38
3.7.3. Recuperação microbiana avançada do petróleo (MEOR)	38
3.7.4. Remoção de poluentes hidrofóbicos adsorvidos em solos	39
3.7.5. Biossurfactantes na agricultura	40
3.7.6. Aplicações na área médica	40
<u>3.7.6.1. Tipos de biossurfactantes e aplicações na área médica</u>	42
3.7.7. Biossurfactantes na mineração	44
3.7.8. Outras aplicações	45
3.7.9. Perspectivas econômicas e de utilização	45
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
 ARTIGO I	
RUFISAN UM NOVO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR CANDIDA LIPOLYTICA UCP 0988: CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES	62
RESUMO	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1. Microrganismo e manutenção	66
2.2. Substrato	66
2.3. Meio de produção	66

2.4. Cinética de crescimento	66
2.5. Cinética de produção de biossurfactante por <i>Candida lipolytica</i> UCP0988	67
2.5.1. Determinação da tensão superficial	67
2.5.2. Isolamento do biossurfactante	67
2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS	68
2.6.1. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante	68
2.6.2. Teste de fitotoxicidade	68
2.6.3. Determinação da composição bioquímica biossurfactante	69
2.6.4. Determinação da carga iônica do biossurfactante	70
<u>Cromatografia em fase gasosa</u>	70
<u>Extração e metilação dos ácidos graxos</u>	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1. Determinação da cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante	71
3.2. Rendimento do biossurfactante	73
3.3. Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante	73
3.4. Fitotoxicidade do biossurfactante	74
3.5. Caracterização bioquímica do biossurfactante	75
4. CONCLUSÕES	76
5. REFERÊNCIAS	77
LISTA DE FIGURAS	85

ARTIGO II

POTENCIAL DE APLICAÇÃO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO E ANTI-ADESIVO DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR <i>CANDIDA LIPOLYTICA</i> UCP 0988	89
RESUMO	90
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1. Microrganismo e Manutenção	92
2.2. Meio de Produção	92
2.3. Isolamento do Biossurfactante	92
2.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana do Biossurfactante	93
2.5. Determinação da Atividade Anti-adesiva do Biossurfactante	93
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1. Atividade Antimicrobiana do Biossurfactante	93
3.2. Atividade Anti-adesiva do Biossurfactante	97
4. CONCLUSÕES	100
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
LISTA DE TABELAS	105

ARTIGO III

REMOÇÃO DE DERIVADO DE PETRÓLEO ADSORVIDO EM SOLOS PELO BIOSSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR <i>CANDIDA LIPOLYTICA</i> UCP 0988	109
RESUMO	110

1. INTRODUÇÃO	111
2. MATERIAL E MÉTODOS	112
2.1. Solos	112
2.2. Fluidos percolantes e contaminante	113
2.3. Caracterização físico-química dos solos	113
2.4. Preparação dos solos	113
2.5. Remoção de óleo motor em colunas empacotadas através de ensaio estático	114
2.6. Remoção de óleo motor em frascos através de ensaio cinético	114
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
3.1. Caracterização física dos solos	114
3.2. Caracterização química dos solos	115
3.3. Caracterização química dos solos após a passagem dos percolantes	115
3.4. Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos	116
3.4.1. <i>Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos contidos em colunas empacotadas</i>	117
3.4.2. <i>Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos contidos em frascos através de ensaio cinético</i>	119
CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
LISTA DE TABELAS	126

ARTIGO IV

APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN NA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS E POLUENTE HIDROFÓBICO CONTIDOS EM SOLO UTILIZADO COMO BARREIRA DE RETENÇÃO DE CHORUME	135
RESUMO	136
1. INTRODUÇÃO	137
2. MATERIAIS E MÉTODOS	140
2.1. Solo	140
2.2. Fluidos percolantes e contaminantes	141
2.2.1. Biossurfactante	141
2.2.2. Chorume (lixiviado)	141
2.2.3. Óleo lubrificante de motor	141
2.3. Preparação das amostras e procedimentos de ensaios	142
2.3.1. Mistura solo e óleo lubrificante	142
2.3.2. Determinação da condutividade hidráulica	142
2.3.3. Permeâmetro de paredes flexíveis	142
2.3.4. Quantificação dos metais pesados no solo natural e no óleo lubrificante de motor	144
2.3.5. Quantificação do óleo lubrificante de motor removido do corpo de prova pela percolação do biossurfactante	144
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
3.1. Caracterização física do solo	144
3.2. Caracterização química do solo	145

3.3. Condutividade hidráulica	146
3.4. Remoção dos metais pesados	146
3.5. Remoção do óleo lubrificante de motor	149
4. CONCLUSÕES	149
5. REFERÊNCIAS	150
LISTA DE TABELAS	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da molécula de um surfactante	23
Figura 2 – Força de atração existente entre as moléculas dos líquidos	26
Figura 3 – Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida: a) Moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas	26
Figura 4 – Formação de micelas na CMC	27
Figura 5 – Moléculas de surfactantes atuando na remoção de compostos hidrofóbicos	38

ARTIGO I

PROPRIEDADES DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP 0988

Figura 1 – Cinética de crescimento da <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988, pH, tensão superficial do líquido metabólico obtido e rendimento do biosurfactante obtido em meio de baixo custo	86
Figura 2 – Concentração micelar crítica (CMC) do biosurfactante produzido por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988 em meio de baixo custo	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipo e origem microbiológica dos biossurfactantes	28
Tabela 2 – Tensões superficiais e substratos utilizados na produção de biossurfactantes por espécies de <i>Candida</i> e tensões superficiais de surfactantes sintéticos	30
Tabela 3 – Matérias-primas de baixo custo e respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes	36
Tabela 4 – Exemplos de biossurfactantes e suas aplicações na área médica	41

ARTIGO II

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIADESIVA DO BIOSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP 0988

Tabela 1 - Porcentagem de inibição de crescimento obtida para diferentes microrganismos utilizando o biosurfactante Rufisan produzido por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988. Desvio padrão ($\pm$) determinado em triplicata	106
Tabela 2 - Taxas de inibição microbiana obtidas no ensaio de atividade antiadesiva do biosurfactante produzido por <i>Candida lipolytica</i> UCP 0988, em microplaca. O tampão fosfato (PBS) é tido como controle e ajustado para 0%, já que não ocorre inibição da adesão microbiana. Desvio padrão ($\pm$) determinado em triplicata	107

ARTIGO III

REMOÇÃO DE DERIVADO DE PETRÓLEO ADSORVIDO EM SOLOS PELO BIOSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP 0988

Tabela 1 – Granulometria, consistência e classificação unificada dos solos	127
Tabela 2 – Característica química dos solos naturais	128
Tabela 3 – Análise química total do solo arenoso contaminado por óleo motor, após a passagem dos percolantes	129
Tabela 4 - Análise química total do solo siltoso contaminado por óleo	130

motor, após a passagem dos percolantes	
Tabela 5 - Análise química total do solo argiloso contaminado por óleo	131
motor, após a passagem dos percolantes	
Tabela 6 – Remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de	132
solos, contidos em colunas empacotadas através de ensaio estático	
Tabela 7 – Remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de	133
solos, contidos em frascos através de ensaio cinético	

ARTIGO IV

APLICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE RUFISAN NA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS E POLUENTE HIDROFÓBICO CONTIDOS EM SOLO UTILIZADO COMO BARREIRA DE RETENÇÃO DE CHORUME

Tabela 1 – Descrição dos corpos de prova e dos percolantes	155
Tabela 2. Granulometria, consistência e classificação unificada do solo	156
Tabela 3 - Caracterização química do solo	157
Tabela 4 - Condutividade hidráulica do solo saturado pelos	158
percolantes	
Tabela 5 - Resultados dos ensaios de avaliação dos metais no solo	159
antes e depois da percolação dos fluidos utilizando FAAS	

RESUMO

Os biossurfactantes são obtidos de fontes renováveis, e por serem biodegradáveis e com baixa toxicidade, apresentam potencial de utilização em várias áreas da biotecnologia. Contudo, devido ao alto custo de produção, esses compostos ainda não são amplamente utilizados. Nesse sentido, o lipopeptídeo Rufisan, um biossurfactante aniônico produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988, surge como alternativa aos surfactantes convencionais, apresentando dualidade de ação como agente antimicrobiano e na biorremediação de substâncias hidrofóbicas e metais pesados. Rufisan reduziu a tensão superficial do meio de produção de 50 mN/m para 25,29 mN/m, com rendimento de 8 g/L, após 72 horas de fermentação. O biossurfactante apresentou uma CMC de 0,03%, não apresentando efeito tóxico para sementes de repolho (*Brassica oleracea*). A maior atividade antimicrobiana foi apresentada para linhagens de *Streptococcus*, demonstrando também efeito anti-adesivo para bactérias e leveduras. Estudos realizados mostraram que o Rufisan, removeu 37% do óleo de motor contido no solo arenoso através de testes estáticos em colunas. Contudo, o biossurfactante na concentração da CMC apresentou grande eficiência removendo 99,5% do óleo de motor contido em todos os solos testados, na condição de batelada. O lipopeptídeo removeu 96% de Zn e Cu, reduzindo as concentrações de Pb, Cd e Fe. Portanto, o conhecimento do processo de otimização da produção do Rufisan, minimizando o custo de obtenção do biopolímero, associado às propriedades apresentadas, sugerem sua ampla utilização em atendimento às demandas comerciais.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*; Resíduo industrial; Biossurfactante; Atividade antimicrobiana; Atividade anti-adesiva; Óleo de motor; Metais

ABSTRACT

The biosurfactants are produced by renewable resources, are biodegradable and have low toxicity and thus show potential to be used in different areas of biotechnology. Despite their advantages, due to the high production costs biosurfactants are not extensively used. In this sense, the lipopeptide Rufisan, an anionic biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988, is an attractive alternative to the synthetic surfactants, showing properties as antimicrobial agent and in biorremediation of hydrophobic compounds and heavy metals. Rufisan reduced the surface tension of the production medium from 50 mN/m to 25.29 mN/m, with a yield of 8 g/L, after 72 hours of fermentation. The biosurfactant showed a CMC of 0.03%, did not show toxic effect against cabbage seeds (*Brassica oleracea*). The highest antimicrobial activity was observed against *Streptococcus* strains. The anti-adhesive effect was also detected for bacteria and yeasts. Studies showed that Rufisan removed 37% of the motor oil contained in sandy soil contained in packed columns. The biosurfactant at the CMC showed great efficiency, removing 99.5% of the motor oil adsorbed in the soils tested in batch experiments. The lipopeptide removed 96% of Zn and Cu, and reduced the concentration of Pb, Cd and Fe. The optimization process of Rufisan production, which permitted the reduction of costs, suggest its ample utilization according to the commercial requirements.

Key-words: *Candida lipolytica*; Industrial residue; Biosurfactant; Antimicrobial activity; Anti-adhesive activity; Motor oil; Heavy Metals.

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais. Esses compostos são formados por estruturas moleculares contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água) (MUTHUSAMI et al., 2008), promovendo a redução da tensão superficial e interfacial, conferindo a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (DELEU; PAQUOT, 2004; GAUTAM; TYAGI, 2006; NITSCHKE; COSTA, 2007).

A importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado em aumentar a produção desses compostos em decorrência da diversidade de utilizações nas indústrias, em especial nas indústrias petrolífera, alimentícia, farmacêuticas, de higiene, têxtil e de cosméticos (CALVO et al., 2009; SINGH et al., 2007; BARROS et al., 2007; SARUBBO et al., 2007). No entanto, o maior mercado para essas biomoléculas pode ser a indústria petrolífera, onde podem ser amplamente utilizados na recuperação melhorada do petróleo (MEOR – Microbial Enhanced Oil Recovery), na remoção e mobilização de resíduos oleosos e metais pesados, na limpeza de tanques de estocagem e na biorremediação (SARUBBO et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2006).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, as novas legislações de controle ambiental têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes (MAYER; SOBERON-CHAVES, 2000; SARUBBO et al., 2001).

Surfactantes microbianos ou biossurfactantes são metabólitos produzidos principalmente por bactérias e leveduras, embora alguns fungos filamentosos também os produzam (RON; ROSENBERG, 2002). Esses compostos, por serem biodegradáveis e compatíveis com o meio ambiente, ao contrário dos similares petroquímicos (sintéticos), têm sido cada vez mais estudados (SARUBBO et al., 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Os biossurfactantes apresentam, ainda, inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como baixa toxicidade, estabilidade frente à ampla faixa de pH e sob temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas (SINGH et al., 2007; RUFINO et al., 2007). Os tipos de estrutura e as quantidades de biossurfactantes produzidas são determinados a partir da escolha e concentração do(s) substrato(s) utilizado(s) que podem ser solúveis e insolúveis, bem como pela concentração de íons como P, N, Mg, O e Fe no meio de cultura, além das condições de cultivo (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007).

Os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar, enquanto que os biossurfactantes são diferenciados por sua natureza bioquímica e pela espécie microbiana produtora. As principais classes incluem os glicolipídeos, os lipopeptídeos, as lipoproteínas, os biossurfactantes poliméricos, os fosfolipídeos e alguns ácidos graxos (VAN-HAMME et al., 2006).

A classe dos glicolipídeos compreende um grupo dos mais conhecidos e estudados, apresentando longas cadeias de ácidos graxos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos. Nessa classe destacam-se os raminolipídeos da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e os soforolipídeos de espécies de leveduras do gênero *Candida* (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008; TULEVA et al., 2009).

Surfactantes sintéticos são utilizados na recuperação e solubilização de compostos hidrofóbicos orgânicos do solo, embora a eficiência desses compostos seja reduzida. Além disso, muitos surfactantes sintéticos utilizados são tóxicos e não biodegradáveis; sendo assim, a utilização desses compostos no meio ambiente pode induzir a acumulação de materiais ecologicamente prejudiciais ao solo (MULLIGAN et al., 2001; BILLINGSLEY et al., 2002; DOONG; LEI, 2003).

Recentemente, os biossurfactantes vêm despertando o interesse dos pesquisadores para aplicação nos processos de biorremediação de solos contaminados por óleos e metais pesados (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; LAI et al., 2009). Outras aplicações promissoras incluem as áreas médica e farmacêutica, além de novas possibilidades de utilização desses compostos em áreas que se beneficiem de suas propriedades anfipáticas (RODRIGUES et al., 2006).

A despeito das vantagens dos biossurfactantes frente aos similares petroquímicos, esses ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros, embora esse custo possa ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis, bem como através da obtenção de altos rendimentos do produto (GALLERT; WINTER, 2002; TULEVA et al., 2009).

Nesse contexto, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes, uma vez que a seleção do substrato possa representar uma redução de até 30% do custo total do processo (MANEERAT, 2005). Resíduos de destilaria (BABU et al., 1996; DUBEY; JUWARKAR, 2001), soro de queijo (KOCH et al., 1988), melaço (PATEL; DESAI, 1997) e efluente de óleo de oliva (MERCADÈ et al.,

1994), entre outros, têm sido descritos como substratos para a produção de biossurfactantes.

Considerando que um dos parâmetros mais importantes na seleção de biossurfactantes eficientes é a habilidade de redução da tensão superficial, o biossurfactante Rufisan, produzido recentemente por *Candida lipolytica* UCP 0988 cultivada em resíduo de refinaria de óleo vegetal como substrato, apresenta-se como uma nova biomolécula com características atrativas, considerando sua habilidade de reduzir a tensão superficial para valores de 25,29 mN/m (RUFINO et al., 2008). Nesse sentido, o potencial biotecnológico do Rufisan foi avaliado para estabelecer as propriedades químicas e biológicas e, explorar as possibilidades de aplicação na área médica, como agente antimicrobiano e anti-adesivo, bem como na área ambiental, na remoção de derivado de petróleo e metais pesados em solos contaminados, visando propor novas aplicações até então não exploradas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produção otimizada do biossurfactante Rufisan por *Candida lipolytica* UCP 0988, caracterização bioquímica, avaliação do seu potencial biotecnológico e aplicação nas áreas médica e ambiental.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a cinética de crescimento do microrganismo e produção do biossurfactante em meio previamente otimizado;
- Isolar o biossurfactante e determinar o rendimento de produção;
- Determinar a Concentração Micelar Crítica do biossurfactante;
- Caracterizar os ácidos graxos do biossurfactante por Cromatografia Gasosa;
- Determinar a carga iônica do biossurfactante;
- Identificar a composição bioquímica do biossurfactante;
- Determinar o potencial fitotóxico do biossurfactante;
- Testar a atividade antimicrobiana e anti-adesiva do biossurfactante;
- Avaliar a aplicação do biossurfactante bruto e isolado na remoção de poluente hidrofóbico adsorvido em diferentes solos através de ensaio estático em colunas empacotadas;
- Avaliar a aplicação do biossurfactante isolado, na remoção de poluente hidrofóbico adsorvido em diferentes solos através de ensaios cinéticos em frascos;
- Avaliar a aplicação do biossurfactante bruto na remoção de metais pesados e poluente hidrofóbico contidos em solo utilizado como barreira de retenção de chorume em permeâmetro de paredes flexíveis.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossurfactantes: considerações gerais

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos utilizados em diversas aplicações (RUFINO et al., 2008). A maioria dos surfactantes disponíveis são sintetizados a partir de derivados do petróleo. Contudo, a preocupação ambiental levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar) (Figura 1). A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (SOBRINHO et al., 2008; LUNA et al., 2009).

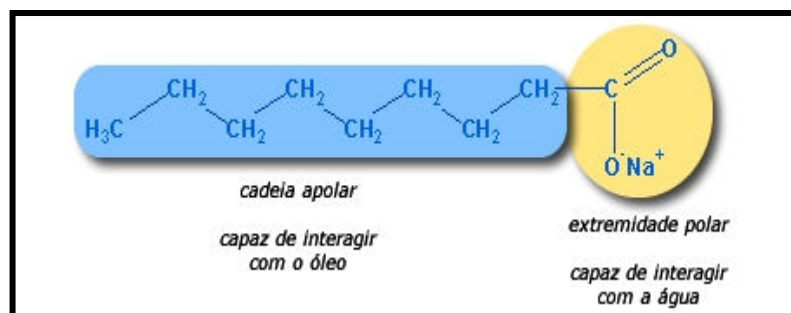


Figura 1- Ilustração da molécula de um surfactante

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, promove a redução da tensão interfacial e superficial. Esta propriedade faz os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (BOGNOLO, 1999). A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de toneladas por ano, sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico (BANAT et al., 2000).

Vários compostos com propriedades tenso-ativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até microrganismos (glicolipídeos) e também pelo ser

humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais (BANAT et al., 2000).

Atualmente, nos países industrializados 70 – 75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica (NITSCHKE et al., 2004). Entretanto, as indústrias, pressionadas pelas organizações de defesa do meio ambiente estão muito interessadas em encontrar uma forma de produzir surfactantes menos tóxicos (DELEU; PAQUOT, 2004). Esta tendência é movida pela necessidade da criação de produtos mais brandos, para a substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados), como também para aumentar a especificidade dos produtos (URUM; PEKDEMIR, 2004).

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 e leveduras. Os microrganismos sintetizam os biossurfactantes, geralmente durante o crescimento em substratos imiscíveis em água (MULLIGAN, 2005).

A utilização de técnicas para obtenção de surfactantes a partir de microrganismos representa um elevado interesse no campo aplicado (SEN; SWAMINATAN, 2005). Vários produtos microbiológicos com propriedades surfactantes foram identificados no passado. Entre os diversos microrganismos estudados para a produção de biossurfactantes estão o *Arthrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Candida lipolytica* e *Torulopsis bombicola* (MULLIGAN, 2005).

3.2 Propriedades dos biossurfactantes

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Segundo Bognolo (1999), muitas destas características representam uma vantagem sobre os surfactantes convencionais:

- atividade superficial e interfacial: os biossurfatantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial com menores concentrações de biossurfatante (COOPER; PADDOCK, 1984). Segundo Mulligan; Gibbs (1993), a concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L. A tensões interfacial e superficial (medida de efetividade) de um bom biossurfactante devem ser menores que 1 e 30 mN/m, respectivamente. Bognolo (1999) comparou a CMC de biossurfactantes e tensoativos sintéticos demonstrando que os primeiros apresentam menor CMC, ou seja, são mais eficientes que os surfactantes convencionais.

- tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. O lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 horas e pH entre 5-12 (HOROWITZ et al., 1990). Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl, enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999).
- biodegradabilidade: diferentes dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN; GIBBS, 1993).
- baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998) e sua baixa toxicidade permite seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (FLASZ et al., 1998). Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuírem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (DESAI; BANAT, 1997).

Segundo Reiser et al. (1989) os biossurfactantes possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de efetividade e eficiência. Outra vantagem dos biossurfactantes reside no fato de serem compostos que não são derivados de petróleo, fator importante à medida que os preços do petróleo aumentam. Além disso, a estrutura química e as propriedades físicas dos biossurfactantes podem ser modificadas através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas.

Tensão Superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A tensão superficial é a força de atração, existente entre as moléculas dos líquidos (Figura 2). A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (Figura 3). A concentração dessas micelas forma a CMC. Esta concentração corresponde à mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (Figura 4).

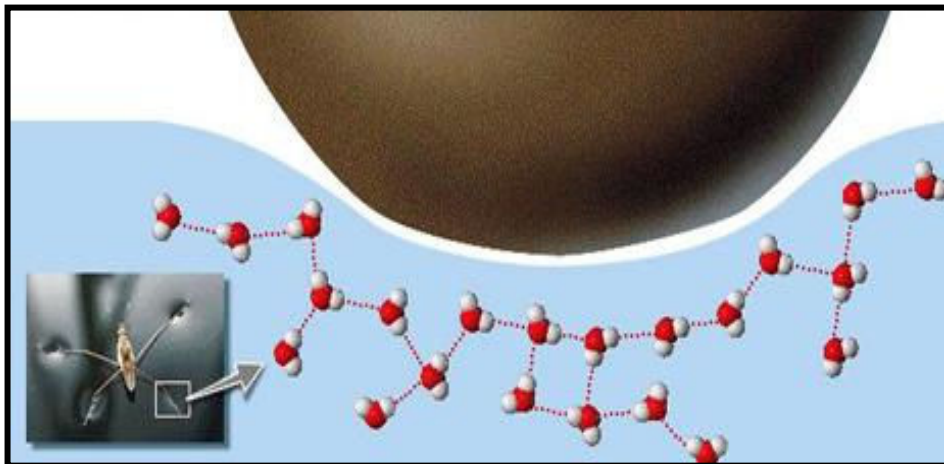


Figura 2 – Força de atração existente entre as moléculas dos líquidos

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>

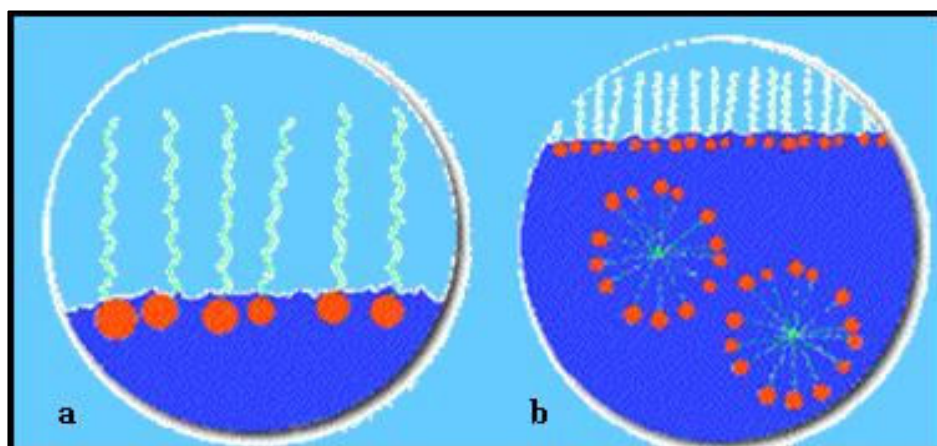


Figura 3 - Posicionamento das moléculas dos surfactantes em fase líquida:
a) moléculas na interface ar-água; b) formação de micelas

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>

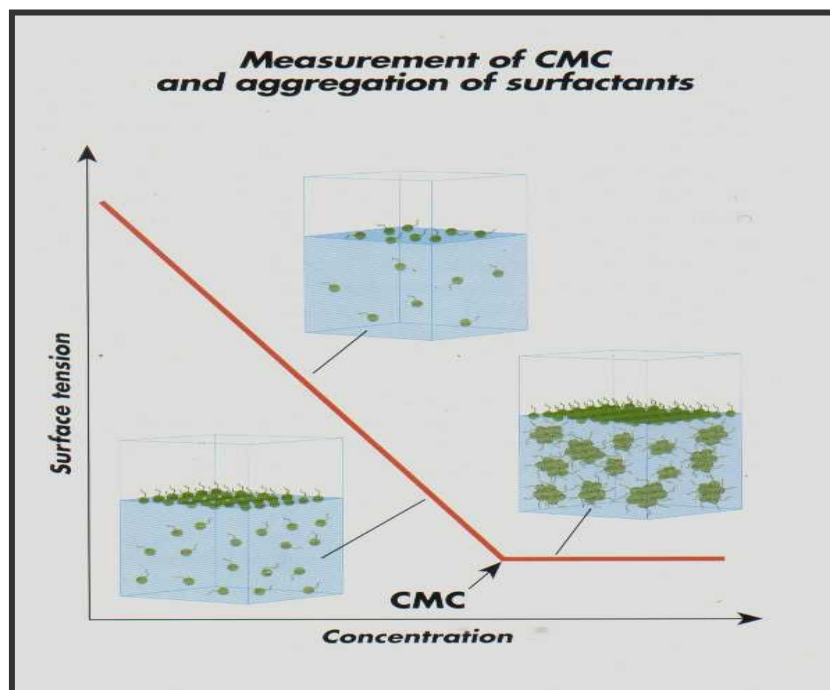


Figura 4 – Diagrama ilustrativo da formação de micelas na CMC

Fonte: <http://www.virtuallaboratory.ne>

3.3 Microrganismos Produtores

Uma variedade de microrganismos é capaz de produzir biossurfactantes (Tabela 1), com diferentes estruturas moleculares. Embora o potencial de produção seja determinado pela genética do microrganismo, outros fatores como as condições ambientais e a natureza do substrato também influenciam o nível de expressão (RHAMAN et al., 2002).

Tabela 1 - Tipo e origem microbiológica dos biossurfactantes

Tipo de surfactante	Microrganismo
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia rubidea</i>
	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i>
Soforolipídeos	<i>Candida lipolytica</i>
	<i>Candida bogoriensis</i>
	<i>Alcanivorax borkumensis</i>
Glicolipídeos	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.
	<i>R. erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i>
	<i>Tsukamurella</i> sp.
Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter</i> sp.
	<i>Capnocytophaga</i> sp.
	<i>Penicillium spiculispurum</i>
Ácidos Graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
	<i>Talamyces trachyspermus</i>
	<i>Nocardia erythropolis</i>

Fonte: MULLIGAN, GIBBS, 1993

Em estudos com duas espécies de leveduras, *Pichia membranaefaciens* e *Pichia anomala*, cultivadas em meio mineral contendo 2 % de glicerol, ocorreu produção de biossurfactantes. O mesmo não ocorreu quando gasolina e querosene a 2 % foram adicionados como substratos (ARAGÃO et al., 2007).

As bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* também são descritas na literatura como grandes produtoras de biossurfactantes. *Bacillus subtilis* são produtores de lipopeptídeos, como a chamada surfactina, a qual contém sete aminoácidos ligados aos grupos carboxila e hidroxila do ácido C₁₄ (KAKINUMA et al., 1969). Concentrações de surfactina menores que 0,005 % reduzem a tensão superficial para 27 mN/m. A solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, por outro lado, depende do tipo de resíduo utilizado como substrato (HUE et al., 2001).

Em 2003, Queiroga e colaboradores utilizaram o *Bacillus subtilis* para avaliação da tensão superficial na produção de biossurfactantes em presença de petróleo, observando uma redução de tensão superficial de 53 mN/m para 25,7 mN/m.

Um grupo de biossurfactantes muito estudado é o de raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (HITSATSUKA et al., 1971; GUERRA-SANTOS et al., 1984). Valores de tensão superficial de 29 mN/m são característicos desses componentes, que podem ser produzidos a partir de vários substratos solúveis e insolúveis (ROBERT et al., 1989). A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, pH, composição dos nutrientes, substrato e temperatura utilizada (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

Em 2005, Maneerat descreveu a produção de microrganismos marinhos como produtores de biossurfactante empregado na biorremediação em solo de praias poluídas com óleo.

3.3.1 Produção de biossurfactantes por leveduras do gênero *Candida*

Entre as leveduras, espécies de *Candida* têm sido largamente empregadas com sucesso na fermentação de hidrocarbonetos e conseqüentemente para produção de biossurfactantes. Cirigliano e Carman (1984, 1985) isolaram, inicialmente, um bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para uso em sistemas alimentares, enquanto que Marçal (1991) demonstrou a produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais.

Sarubbo e colaboradores (1997; 1999; 2001) também utilizaram a *Candida lipolytica* na produção de agentes surfactantes em meios contendo óleo vegetal de babaçu e glicose como substratos. A *Candida bombicola* tem se destacado como produtora de biossurfactantes. Segundo a literatura, essa levedura apresentou alto rendimento em biossurfactante (67 g/L) quando este foi produzido a partir de óleo de milho e glicose em fermentador (PERSSON et al; 1999).

Sarubbo e colaboradores (2006) demonstraram a possibilidade de combinação entre duas fontes, uma solúvel e outra insolúvel, para a produção de biossurfactantes por *Candida glabrata* e *Candida lipolytica* (SARUBBO et al., 2007); enquanto que Rufino et al. (2007; 2008) aplicou com sucesso um resíduo industrial na produção de um biossurfactante por *Candida lipolytica*. Recentemente, Sobrinho et al. (2008), estudaram a produção de biossurfactante por *C. sphaerica* UCP 0995 utilizando dois resíduos industriais como substratos, obtendo resultados satisfatórios.

A tabela 2 ilustra as tensões superficiais e os substratos utilizados na produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* e sua comparação frente a surfactantes sintéticos.

Tabela 2 - Tensões superficiais e substratos utilizados na produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* e tensões superficiais de surfactantes sintéticos

Microrganismo / surfactantes sintéticos	Tensão superficial (mN/m)	Substratos	Referências
<i>Candida albicans</i> 39A2	35	Óleo de girasol	HABA et al., 2000
<i>Candida albicans</i>	43	Óleo de girassol	HABA et al., 2000
<i>Candida rugosa</i> 1970 IFO0750	39	Óleo de girassol	HABA et al., 2000
<i>Candida tropicalis</i> CECT 1440	39	Óleo de oliva	HABA et al., 2000
<i>Candida lipolytica</i> CECT 1357	40	Óleo de girasol	HABA et al., 2000
<i>Candida torulopsis</i>	45	Óleo de oliva	HABA et al., 2000
<i>Candida glabrata</i>	31	Óleo de algodão e glicose	SARUBBO et al., 2006
<i>Candida sphaerica</i>	25	Milhocina e resíduo de óleo de soja	LUNA et al., 2009
<i>Candida lipolytica</i>	31	Óleo de canola e glicose	SARUBBO et al., 2007
<i>Candida lipolytica</i>	25,26	Resíduo de óleo vegetal	RUFINO et al., 2008
Brometo de n-hexadecil Trimetil- amônio (CTBA)	55,0	-	BEHRING et al., 2004
Alquilbenzeno sulfonato	47,0	-	BEHRING et al., 2004
Lauril – Sulfato de sódio (SDS)	37,0	-	BEHRING et al., 2004
Tween 80	45,0	-	BEHRING et al., 2004

3.4 Biossíntese dos biossurfactantes

Geralmente os caminhos para a síntese dos dois grupos que compõem o biossurfactante ocorrem através de um conjunto de enzimas específicas. Mesmo considerando a diversidade de produção, algumas características da síntese e regulação são semelhantes, sendo que em muitos casos as primeiras enzimas são apenas de ação reguladora (DESAI; BANAT, 1997).

O microrganismo utiliza primeiramente substratos hidrofílicos para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante. As espécies de *Candida* são capazes de incorporar diretamente ácido graxo para a produção de biossurfactante (WEBER et al., 1992).

Uma possível via de síntese dos biossurfactantes pode ser através da conversão de glicose, em outros sacarídeos como sofrorose e maltose, ou com a divisão via gliceraldeído 3-P e piruvato para acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo. Já o hidrocarboneto, quando presente como substrato, pode ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos, através da transformação da molécula em álcool e depois em aldeído e ácido graxo por ação enzimática. O ácido graxo formado pode sofrer β -oxidação passando a acetil-CoA e, a partir deste momento, vários outros poderão ser formados (WEBER et al., 1992).

De acordo com Sydatk e Wagner (1987), a biossíntese do biossurfactante pode acontecer seguindo quatro caminhos diferentes:

- Síntese do carboidrato e do lipídeo;
- Síntese da metade do carboidrato, enquanto que a síntese da metade lipídica dependerá do comprimento da cadeia do substrato carbônico presente no meio;
- Síntese da metade lipídica, enquanto que a síntese da metade de carboidratos dependerá do substrato utilizado;
- Síntese das metades carboidrato e lipídica dependendo do substrato.

3.5 Função fisiológica dos biossurfactantes

Embora, a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas, como:

- transporte de hidrocarbonetos: função atribuída aos biossurfactantes ligados à parede celular de *Candida tropicalis* (COOPER et al., 1981), onde um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana foi detectado quando o

microrganismo cresce em alcanos, indicando que o complexo polissacarídeo - ácido graxo presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos;

- emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (COOPER et al., 1981). Porém, cepas de *Bacillus subtilis* produzem surfactantes apenas em substratos hidrossolúveis (FRANCY et al., 1991);

- atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos. Os ramnolipídeos de *P. aeruginosa* e o surfactin de *B. subtilis*, funcionam como antibióticos solubilizando os principais componentes das membranas celulares microbianas. Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os microrganismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN, 1996; RODRIGUES et al., 2006);

- aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. Os elementos chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células a superfícies. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis (ROSENBERG; RON, 1998).

3.6 Substratos utilizados na produção de biossurfactantes

O mundo produz em torno de 2,5-3 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano, e em torno de 75% dessa produção é derivada de plantas (HABA et al., 2000). Muitos óleos e gorduras são utilizados na indústria de alimentos, gerando grande quantidade de resíduos. A disposição dos resíduos é um problema crescente, que desperta o interesse da utilização deles para transformação microbiana.

Uma variedade de subprodutos, incluindo derivados de óleo vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas tem sido utilizada na produção de muitos metabólitos microbianos. A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que a matéria-prima represente de 10 – 30% do custo total de um produto biotecnológico. Por outro lado, milhões de desperdícios em resíduos poluentes são jogados a cada ano por todo o mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também representam um alto custo para várias indústrias (MUKHERJEE et al., 2006).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes (MAKKAR, CAMEOTRA, 1999; 2002; MERCADE et al., 1997).

Mercade et al., (1993) relataram o uso de efluente da indústria de óleo de oliva (OOME) como novo substrato para produção de biossurfactantes (ramnolipídeos), por *Pseudomonas sp.* Esse efluente é um dos maiores poluentes da indústria agrícola na região mediterrânea, é uma substância escura contendo frações solúveis em água e resíduos da extração do óleo de oliva. OOME contém substâncias tóxicas semelhantes a polifenóis e outras substâncias orgânicas (20 – 80 g/L), compostos nitrogenados (12 – 24 g/L), ácidos orgânicos (5 – 15 g/L) e óleos residuais (0,3 – 5 g/L). Das vinte e duas espécies de *Pseudomonas* testadas, apenas quinze apresentaram um bom crescimento e uma redução na tensão superficial para 30 mN/m (MERCADE et al., 1993).

Resíduos de óleos lubrificantes causam sérios problemas ao meio ambiente, a partícula de óleo pode se juntar à matéria orgânica, a partículas minerais e a organismos, sendo assim uma ameaça ao meio ambiente (SANTA ANNA et al., 2005). Bento; Gaylarde (1996) observaram a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas* em meio mineral com glicose e óleo diesel. Em um estudo similar Muriel et al., (1996) observaram a produção extracelular de biossurfactante por *Cladosporium resinae*. Essa produção foi observada através da redução da tensão superficial e da formação de emulsões.

Mercade et al., (1996) relataram a seleção de microrganismos capazes de utilizar resíduos de óleos lubrificantes para produção de biossurfactantes. De dezoito amostras de solo contaminadas por hidrocarbonetos, quarenta e quatro isolados diferentes foram capazes de crescer em meio contendo óleo lubrificante como fonte de carbono. Apenas 10% das espécies isoladas produziram biossurfactantes.

Sarubbo et al., (1997) avaliaram a produção de bioemulsificantes por duas linhagens de *Candida lipolytica* (1055 e 1120) utilizando meio suplementado com 5% de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono. A produção de bioemulsificantes foi observada na fase exponencial de crescimento e no início da fase estacionária.

Em outro estudo utilizando uma espécie de *Pseudomonas* 42A2 crescida em meio contendo um subproduto do processamento de óleos vegetais, com alta concentração de ácido oléico (98% m/m), Mercade et al., (1997) observaram uma diminuição na tensão superficial do meio de cultura de 55 mN/m para 32 mN/m, e a tensão interfacial de 24 mN/m para 5 mN/m, devido a produção de um novo biossurfactante, caracterizado como ácido 7,10 diidroxí-8E-octadecanóico.

Vollbrecht et al., (1999) estudaram a produção de biossurfactantes utilizando óleos vegetais domésticos. Em seus estudos com *Tsukamurella* DSM 44370, eles obtiveram um bom crescimento e uma boa produção de glicolipídeos em meios contendo óleos vegetais naturais, melhor que os resultados obtidos em meios complexos. O óleo de girassol apresentou um rendimento de produção em torno de 5g/L de glicolipídeos.

Estudos sobre as propriedades físico-químicas dos glicolipídeos produzidos por *Tsukamurella* demonstraram que o glicolipídeo GL1 reduziu a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m, com uma concentração micelar crítica com valor de 10 mg/L. Os glicolipídeos GL2 e GL3 reduziram a tensão superficial da água para 23 mN/m e 24 mN/m, respectivamente (VOLLBRECHT et al., 1999).

Haba et al., (2000) realizaram a seleção de 36 microrganismos para produção de biossurfactantes em meio de cultura líquido, contendo 2% de resíduo de óleo de oliva ou óleo de girassol como fonte de carbono, baixando a tensão superficial para 40 mN/m, essa medida foi utilizada como critério de seleção. Após 72 horas de crescimento muitas espécies de *Pseudomonas* testadas apresentaram crescimento satisfatório, sendo o óleo de oliva o melhor substrato para o crescimento celular e para a produção de biossurfactante, a menor tensão superficial foi de 35 mN/m. Os biossurfactantes produzidos foram ramnolipídeos. Outras espécies foram testadas (*Rhodococcus* sp., *Acinetobacter calcoaceticus* e *Candida* sp.) mas os resultados obtidos não foram comparáveis com os resultados obtidos por *Pseudomonas* (HABA et al., 2000).

Biossurfactantes foram produzidos comercialmente por *Pseudomonas*, com níveis superiores a 100 g/L (MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000). O nível de produção e a combinação com o uso de substratos renováveis e de baixo custo, como os resíduos orgânicos, tornam competitivo o custo de produção dos biossurfactantes com o custo de produção dos surfactantes sintéticos.

Substratos da indústria do processamento de batatas foram avaliados para produção de biossurfactantes. Um estudo realizado por Fox; Bala (2000) demonstrou a ameaça ao meio ambiente dos resíduos ricos em amido das indústrias do processamento de batatas. Thompson et al., (2000) utilizaram efluentes de batata para produção de um biossurfactante, o surfactin. A máxima produção ocorreu na fase estacionária de crescimento, exibindo um bom índice de emulsificação e recuperando solos contaminados por óleos. Dubey; Juwarkar (2001) estudaram a produção de biossurfactantes em meio sintético utilizando um resíduo industrial como fonte de carbono.

Nitschke e colaboradores (2004) selecionaram microrganismos para a produção de biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais. Utilizaram melaço, soro de leite e

manipueira obtendo valores de tensão superficial em torno de 26 mN m^{-1} . Volbrecht et al. (1999) investigaram a produção de biossurfactantes usando óleo vegetal doméstico como substrato da bactéria *Tsukamurella spec* DSM 44370, conseguindo reduzir a tensão da água de 70 mN m^{-1} para 35 mN m^{-1} com CMC de 10 mg l^{-1} . Haba et al. (2000) compararam o uso de óleo de oliva e girassol para a produção de biopolímeros usando valores de tensão superficial até 40 mN m^{-1} como critério de seleção de microrganismos potencialmente produtores.

Mukherjee et al. (2006) descreveram o uso de substratos de baixo custo como alternativa econômica e promissora para a produção de biossurfactantes. Derivados de óleo vegetal, substâncias a base de amido, soro de leite, óleo de babaçu e girassol, melão e efluente de arroz foram utilizados com eficiência na produção de raminolipídeos e soforolipídeos por vários microrganismos.

Diferentes elementos encontrados nos efluentes dos processos industriais também são fontes de nutrientes. Nitrogênio, e ferro foram utilizados para aumentar o rendimento de biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 e *Ustilago maydis* (DUBEY et al., 2004).

Amezcu-Vega e colaboradores (2006) descreveram a importância da relação entre diferentes elementos como C e N, C e P, C e Fe ou C e Mg na produção de biopolímeros e na otimização de seus processos de obtenção.

PIRÔLLO (2006) utilizou a borra oleosa do fundo de tanques da Petrobrás, contendo querosene, óleo diesel e petróleo, foi utilizada como matéria-prima de baixo custo para a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* isolada de solo contaminado.

Rufino et al. (2007) utilizaram um resíduo de óleo de soja para produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* obtendo resultados satisfatórios em termos de tensão superficial. Barros et al. (2007) descreveram a importância da variedade de resíduos industriais como matéria-prima para diversos bioprocessos. Segundo os autores desse trabalho, a utilização de resíduos agroindustriais para produção de biossurfactantes é um dos passos para viabilização e implantação desses processos em escala industrial, sendo necessário um balanço de nutrientes para desenvolver condições adequadas no desenvolvimento e produção.

Luna et al. (2009) obtiveram resultados promissores quando utilizaram a milhocina, um resíduo do processamento do milho, juntamente com um resíduo da indústria de óleo de soja para produção de biossurfactantes por *Candida glabrata*.

Resultados semelhantes foram observados por Sobrinho et al. (2008) para produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*.

A tabela 3 mostra um resumo de algumas matérias-primas de baixo custo e os respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes.

Tabela 3 - Matérias-primas de baixo custo e respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes

Matéria-prima de baixo custo ou resíduos	Tipo de biossurfactante	Espécie microbiana produtora	Rendimento máximo (g l ⁻¹)
Óleo de milho	Glicolípídeo	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	400
Óleo residual de fritura (óleos de oliva e girassol)	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044	2,7
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	11,72
Resíduo de refinaria de óleo vegetal de girassol	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	16
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Glicolípídeo	<i>Candida antarctica</i> e/ou <i>Candida apicola</i>	10,5/13,4
Soro e resíduo de refinaria	Raminolípídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	0,92

Fonte: MUKHERJEE et al., 2006

3.7 Aplicações dos biossurfactantes

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados no processo de extração de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Apresentam aplicações na biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e recuperação terciária de petróleo (VAN DYKE et al., 1991). Outras aplicações promissoras incluem as áreas médica e farmacêutica, além de novas possibilidades de utilização desses compostos em áreas que se beneficiem de suas propriedades anfipáticas (RODRIGUES et al., 2006).

3.7.1 Biorremediação

Os acidentes com derramamento de óleo tornaram-se numerosos e têm causado muitos problemas sociais e ecológicos. Os biossurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos. A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação destes compostos no ambiente. Uma vez que microrganismos degradadores estão presentes em oceanos, a biodegradação constitui um dos métodos mais eficientes de remoção de poluentes. Entretanto, os estudos ainda ocorrem em nível laboratorial e a biorremediação de oceanos utilizando biossurfactantes permanece ainda como um desafio (ATLAS, 1991).

Segundo Lang; Wagner (1993) os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos.

O uso de biossurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. Karanth et al. (1999) relataram a degradação de hexaclorociclohexano pelo biossurfactante produzido por *Pseudomonas* Ptm+. Outros organoclorados como DDT e ciclodienos também foram emulsificados em menor grau. Segundo Miller (1995), os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo.

Bognolo (1999) relatou que os biossurfactantes de *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *B. subtilis* demonstraram resultados promissores na remoção de piche em areias contaminadas.

A figura 5 ilustra a ação de moléculas de surfactantes atuando na remoção de compostos hidrofóbicos.

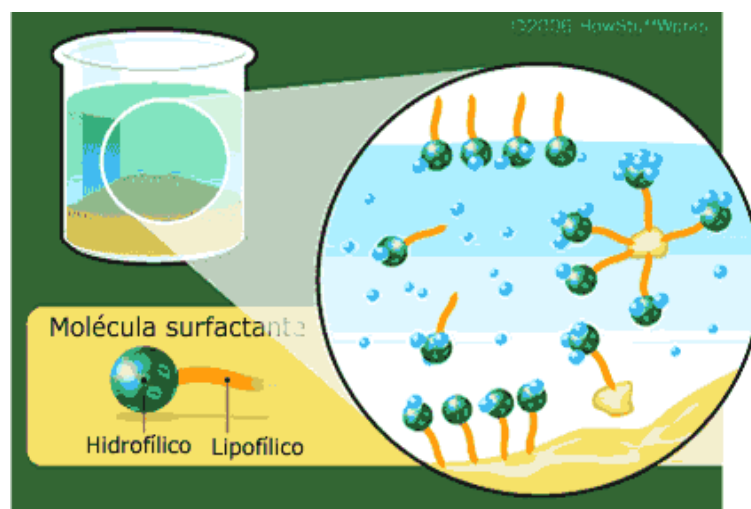


Figura 5 - Moléculas de surfactantes atuando na remoção de compostos hidrofóbicos

3.7.2 Limpeza de reservatórios de óleos

Resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos ou podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e caras. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual pela ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos impactantes (BOGNOLO, 1999).

Banat et al. (1991), utilizaram um biossurfactante produzido pela bactéria Pet 1006 para a limpeza de tanques em substituição aos surfactantes convencionais. O produto bacteriano promoveu a limpeza e recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes no resíduo.

3.7.3 Recuperação microbiana avançada do petróleo (MEOR)

A MEOR (Microbial Enhanced Oil Recovery) consiste de uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual (BANAT, 1995b). O microrganismo

produz polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros do mineral.

Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo nas rochas (BANAT, 1995a; 1995b). Segundo Banat (1995a) o uso de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores de biossurfactantes no reservatório e subseqüentes propagação *in situ*; ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento de microrganismos selvagens produtores de surfactantes; ou ainda a produção de biossurfactantes em reatores e posterior injeção no reservatório. A última estratégia é mais cara devido à necessidade de capital para produção, purificação e introdução do biossurfactante (MOSES, 1987). As outras requerem que o reservatório contenha bactérias capazes de produzir quantidades suficientes de surfactante (BANAT et al., 2000).

Para serem úteis na MEOR *in situ*, os microrganismos devem estar aptos a crescer em condições extremas como alta temperatura, pressão, salinidade e baixo fluxo de oxigênio (KARANTH et al., 1999). Muitos microrganismos adaptados a condições extremas e com capacidade para recuperação de óleo cru têm sido isolados e estudados. Jenneman et al. (1983), propuseram o uso em MEOR do isolado *Bacillus licheniformis* JF-2, anaeróbio, halotolerante e termotolerante e produtor de um biossurfactante muito efetivo.

3.7.4 Remoção de poluentes hidrofóbicos adsorvidos em solos

Os biossurfactantes podem aumentar a remoção de poluentes hidrofóbicos através de processos de solubilização e mobilização (BAI et al., 1997). A capacidade de solubilização depende da habilidade do surfactante em aumentar a solubilidade dos constituintes hidrofóbicos na fase aquosa. Um grande aumento desta capacidade é observado acima da CMC, que é atribuído à partição do hidrocarboneto no sítio hidrofóbico das micelas surfactantes. Neste processo, maiores concentrações em surfactantes são normalmente requeridas uma vez que a solubilidade dos constituintes dos hidrocarbonetos na solução surfactante dependerá totalmente da concentração do surfactante (BAI et al., 1997).

A mobilização pode ser dividida em deslocamento e dispersão. O deslocamento consiste na liberação de gotas de hidrocarbonetos do meio poroso devido à redução da tensão interfacial. Partindo de uma explicação teórica, os hidrocarbonetos serão removidos se a tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase oleosa for suficientemente reduzida a fim de superar as forças de capilaridade que causam a formação da saturação

residual. A dispersão é o processo no qual o hidrocarboneto é disperso na fase aquosa como emulsões 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).

A eficiência de um surfactante na remoção de compostos hidrofóbicos depende também do pH e da força iônica da solução, que pode alterar a configuração dos agregados micelares e a sorção do surfactante ao solo. A sorção do surfactante ao solo limita, por sua vez, o transporte do hidrocarboneto pelo surfactante (BORDAS et al., 2007).

3.7.5 Biossurfactantes na agricultura

Os biossurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são hidrofóbicos e agentes emulsificantes são necessários para dispersá-los em soluções aquosas (ROSENBERG; RON, 1998). Patel & Gopinathan (1986) relataram que biossurfactantes de *Bacillus* foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis.

Vários relatos tratam da eficiência de surfactantes sintéticos no controle da podridão do pepino e da pimenta causada por *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici* (STANGHELLINI et al., 1996). Em alguns experimentos foi observado que os ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* em uma solução nutritiva, causaram lise em zoosporos (STANGHELLINI; MILLER, 1997). O biossurfactante apresentou atividade zoosporicida contra espécies de *Pythium*, *Phytophthora* e *Plasmopara* em baixas concentrações. A avaliação do controle biológico por um grupo de ramnolipídeos levou a conclusão que os biossurfactantes apresentam potencial para utilização no controle biológico de fitopatógenos.

3.7.6 Aplicações na área médica

A aplicação de biossurfactantes na medicina tem sido pouco explorada, embora os resultados obtidos estejam, cada vez mais, impulsionando os estudos nessa área (BENINCASA et al., 2004).

Alguns biossurfactantes apresentam propriedades adequadas para utilização como

agentes antimicrobianos e agentes terapêuticos efetivos, como descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Exemplos de biossurfactantes e suas aplicações na área médica
(RODRIGUES et al., 2006)

Microrganismos Produtores	Tipo de biossurfactante	Aplicações
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ramnolipídeo	-Atividade antimicrobiana contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	surfactina	-Atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) -Atividade antiviral contra o vírus da herpes simples (HSV-1)
<i>Bacillus pumilus</i>	Pumilacidina	-Atividade de proteção contra úlceras gástricas (<i>in vivo</i>)
<i>Bacillus subtilis</i>	iturina	-Atividade antimicrobiana contra micoses profundas
<i>Bacillus licheniformis</i>	lichenisina	Atividade antibacteriana
<i>Candida antártica</i>	mannosylerythritol	-Propriedades antimicrobianas, imunológicas e neurológicas
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	treahalose	Atividade antiviral contra o HSV e o vírus da influenza
<i>Streptococcus thermophilus</i>	glicolipídeo	Atividade anti-adesiva contra várias espécies de bactérias e leveduras isoladas de próteses de voz
<i>Streptococcus mitis</i>	não identificado	Atividade anti-adesiva contra <i>Streptococcus mutans</i>
<i>Lactobacillus</i>	surlactina	Atividade anti-adesiva contra vários patógenos incluindo bactérias entéricas
<i>Lactococcus lactis</i>	não identificado	Atividade anti-adesiva contra várias espécies de bactérias e leveduras

3.7.6.1 Tipos de biossurfactantes e aplicações na área médica

Uma extensa quantidade de estruturas químicas são atribuídas aos biossurfactantes, como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos proteínas-polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros, como descrito anteriormente (MORIKAWA et al., 1993; LIN et al., 1996; ANGELOVA;SCHMAUDER, 1999; AHIMOU et al., 2001). Alguns desses biossurfactantes são descritos como compostos biologicamente ativos para aplicação na área médica:

Lipopeptídeos

Dentre as categorias dos biossurfactantes, os lipopeptídeos são particularmente interessantes em função da sua alta atividade superficial e potencial antibiótico. Lipopeptídeos podem atuar como antibióticos, antivirais e agentes antitumorais, imunomoduladores, toxinas específicas ou inibidores de enzimas.

O biossurfactante Iturina A produzido por *Bacillus subtilis*, consiste em um poderoso lipopeptídeo com atividade antifúngica relatado pela primeira vez por Besson et al. (1976). O mecanismo de ação do Iturina A está relacionado à permeabilidade da membrana plasmática, pela formação de pequenas vesículas e agregação de partículas intramembranas nas células de leveduras. Além disso, também aumenta significativamente a condutividade elétrica de biomoléculas nas membranas lipídicas (THIMON et al., 1995). Ahimou et al. (2001) relataram o perfil do lipopeptídeo Iturina e sua poderosa ação na alteração da hidrofobicidade bacteriana. Também foi proposta a utilização do Iturina A como agente efetivo contra micoses profundas (TANAKA et al., 1997). Outros membros do grupo Iturina, incluindo o Bacillomycin D e Bacillomycin Lc, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Aspergillus flavus*, porém a diferença de comprimento da cadeia lipídica induziu a atividade do lipopeptídeo contra outros fungos (MOYNE et al., 2001). Desse modo, os biossurfactantes semelhantes aos pertencentes ao grupo Iturina podem ser utilizados como potentes agentes antifúngicos alternativos.

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico também produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*, bem conhecido por suas propriedades antimicrobianas (AHIMOU et al., 2001). A surfactina apresenta grande eficiência na modificação das características da hidrofobicidade superficial do *B. subtilis*. Esse aspecto é essencial, em associação com as propriedades antifúngicas que os lipopeptídeos apresentam para utilização no controle biológico das doenças das plantas. É também conhecida por sua interação com protoplastos e vírus envelopados (VOLLENBROICH et al., 1997). Existem três tipos de Surfactina: A, B e C, que são classificadas de acordo com a diferenciação da sequência

de aminoácidos. Morikawa et al. (1993) identificaram e caracterizaram o Biossurfactante arthrofactina produzido por espécies de *Arthrobacter*, cuja eficácia foi comprovada ser sete vezes superior à da surfactina.

Glicolipídeos

É a classe mais comum dos biossurfactantes, com muita efetividade sob o ponto de vista de suas propriedades superficiais. São eles: lipídeos trealose, obtidos de *Mycobacterium* e bactérias relacionadas, os raminolipídeos obtidos por espécies de *Pseudomonas* e os soforolipídeos obtidos de leveduras. Otto et al. (1999) descreveram a produção de lipídeos sulfurosos (SLs) usando soro de leite desproteínizado como substrato. Algumas propriedades antimicrobianas, imunológicas e neurológicas também foram atribuídas ao manosylerythritol lipídeo (MEL), um Biossurfactante glicolipídico produzido por espécies de *Candida* cultivadas em óleos vegetais. Kitamoto et al. (1993) demonstraram a atividade antimicrobiana do MEL, particularmente contra bactérias Gram-positivas.

Isoda et al. (1997) investigaram a atividade biológica de sete glicolipídeos incluindo MEL-A, MEL-B, lipídeo polyol, raminolipídeo, SL e succinoyl-trealose lipídeos STL-1 e STL-3. Exceto para os raminolipídeos, todos os outros glicolipídeos testados induziram à diferenciação celular em lugar da proliferação celular das células de origem HL60 da leucemia promielocítica. As atividades de indução da diferenciação foram atribuídas à interação específica que eles apresentam em vez de um simples ação detergente.

Outros biossurfactantes com atividades biológicas

Nielsen et al. (1999) relataram a viscosinamida, um peptídeo cíclico, como um novo agente antifúngico produzido por *Pseudomonas fluorescens* com diferentes propriedades quando comparado ao Biossurfactante viscosina, produzido pela mesma espécie e com a mesma propriedade antibiótica (NEU et al., 1990).

O Massetolides A-H, também um peptídeo cíclico isolado de espécies de *Pseudomonas* provenientes de habitat marinho, exibiu atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium-intracellulare* (GERARD et al., 1997). O Biossurfactante esfingolipídico inibiu a interação do *Streptococcus mitis* com as células do epitélio bucal e a interação do *Staphylococcus aureus* com as células da mucosa nasal (BIDEL et al., 1992).

Alguns biossurfactantes podem ser utilizados com segurança como agentes terapêuticos efetivos (BANAT et al., 2000; SINGH;CAMEOTRA, 2004). O efeito dos

biossurfactantes nas células humanas e animais têm aumentado o interesse dos cientistas.

MELs produzidos por *Candida antartica* (KITAMOTO et al., 1993) e raminolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (LANG;WULLBRANDT, 1999; MAIER;SOBERON-CHAVEZ, 2000) também demonstraram atividade antimicrobiana.

Possíveis aplicações para os biossurfactantes como agentes emulsificantes para o transporte de drogas, como agentes suplementares ao surfactante pulmonar e como agentes auxiliares como dispersantes para vacinas foram sugeridos (KOSARIC, 1987).

3.7.7 Biossurfactantes na mineração

Os biossurfactantes podem ser utilizados para a dispersão de minerais inorgânicos em mineração e processos fabris. Kosaric et al. (1987) isolaram compostos tensoativos produzidos por culturas de *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp., que podem ser utilizados para flotação e separação de eschelita e calcita. A recuperação foi de 95% para CaWO_4 (tungstato de cálcio) e 30% para CaCO_3 (carbonato de cálcio) respectivamente, ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais. Cameotra e Makkar (1998) aplicaram biossurfactantes para a solubilização parcial do carvão utilizando uma preparação de biossurfactante produzido por *Candida bombicola*.

Uma solução para a remediação de solos contaminados por metais consiste no uso de surfactantes, os quais podem ser adicionados em soluções, facilitando a solubilização, dispersão e dessorção dos contaminantes do solo. Vários surfactantes sintéticos têm sido avaliados em testes de descontaminação (ELLIS, et al., 1985; NASH et al., 1987), embora a necessidade de substituição de compostos sintéticos por similares naturais tem levado ao desenvolvimento de pesquisas com biossurfactantes.

Mulligan et al. (1999) utilizaram surfactina de *Bacillus subtilis* para o tratamento de solos e sedimentos contaminados por Zn, Cu, Cd, óleo e graxa, verificando que os metais pesados associados com carbonato, óxidos e frações orgânicas podem ser removidos usando uma combinação de surfactina e NaOH. Ochoa-Loza et al. (2001) observaram uma complexação de metais pesados como cádmio, chumbo e mercúrio por um mono-raminolipídio produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.

Maslin e Maier (2000) observaram que um biossurfactante do tipo raminolipídio pode diminuir a toxicidade e aumentar a degradação de poluentes orgânicos através de uma complexação de metais pesados. Mulligan et al., (2001) utilizaram surfactina,

raminolipídeos e soforolipídeos em experimentos para remoção de metais pesados de sedimentos.

3.7.8 Outras aplicações

Vários produtos necessitam de surfactantes em seus ingredientes, incluindo repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas, pasta de dentes etc (KLECKNER; KOSARIC, 1993; MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Os biossurfactantes podem ser utilizados em produtos de higiene pessoal, pois apresentam baixa toxicidade (BROWN, 1991). Alguns soforolipídeos são utilizados comercialmente como umectantes para incorporação em produtos de maquiagem. De acordo com Desai; Banat (1997) a KAO Co. LTDA desenvolveu um processo fermentativo para a produção de soforolipídeos, que são esterificados posteriormente, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (DESAI; BANAT, 1997). A preparação de biossurfactantes por ação enzimática, principalmente por lipases, sobre moléculas hidrofóbicas, deu uma nova dimensão à produção destes compostos, principalmente para aplicação em produtos de higiene e cosméticos (BANAT et al., 2000).

Os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes para o processamento de matérias-primas. A emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (BANAT et al., 2000).

Os agentes tensoativos encontram aplicação em panificação e produtos cárneos, onde influenciam nas características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (VATER, 1986). O bioemulsificante produzido por *Candida utilis* tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (SHEPHERD et al., 1995).

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem a indústria de papel, têxtil e cerâmica. O biodispersan tem aplicação na indústria de tintas (ROSENBERG; RON, 1998), facilitando o manuseio, pois as partículas decantam mais lentamente, gerando maior espalhabilidade e aumentando as propriedades de mistura. Os biossurfactantes também são utilizados na fabricação de extintores de incêndio para a estabilização de espuma (REISER et al., 1989).

3.7.9 Perspectivas econômicas e de utilização

Nas últimas décadas, a produção de biossurfactantes por vários microorganismos tem sido intensivamente estudada, o que permite que se tenha, hoje, uma boa quantidade de dados em relação a sua produção, tipos e propriedades. Apesar de possuir muitas propriedades comercialmente atrativas e claras vantagens em comparação aos seus homólogos sintéticos, a produção de surfactantes microbianos em escala comercial ainda não foi completamente atingida devido aos seus baixos rendimentos e altos custos de produção – para isso seria necessário que fossem produzidos e recuperados de forma mais lucrativa e em grande escala.

A economia de produção de todos os metabólicos microbianos é determinada por três fatores básicos: (i) custos da matéria-prima inicial; (ii) disponibilidade de procedimentos adequados e econômicos de produção e recuperação; e (iii), o rendimento de produção dos microrganismos produtores (MUKHERJEE et al., 2006).

Os processos biotecnológicos são considerados operações onerosas especialmente no caso da produção de biossurfactantes (SANTA ANNA et al., 2005). Contudo, o sucesso da produção dos biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos de baixo custo e da utilização de matérias primas que não ultrapassem 10 – 30% do custo total (COOPER et al., 1981). Os biossurfactantes competem com dificuldade com os surfactantes petroquímicos, devido a três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção. O grande custo de produção é bem tolerado para biossurfactantes usados em pequenas quantidades em produtos caros, como cosméticos, medicamentos, entre outros. Mas, em outras aplicações, como a recuperação de óleos, os altos custos de produção são incompatíveis (PANDEY et al., 2000).

Milhões de toneladas de resíduos industriais são gerados e rejeitados no meio ambiente todos os anos podendo, na grande maioria das vezes serem reutilizados. Pesquisas visando selecionar substratos adequados e de baixo custo para a produção de biossurfactantes, destacam os resíduos agro-industriais, como os do processamento dos óleos de soja, milho, coco, amendoim e canola, gorduras animais, açúcar de beterraba, sorgo, casca de soja, bagaço da cana-de-açúcar e resíduos do processamento de algumas frutas como maçã, banana e abacaxi (GALLERT; WINTER, 2002).

Pesquisas relacionadas com a otimização da produção de biossurfactantes a partir de substratos oleosos regionais demonstraram a produção desses compostos por espécies de *Candida* (MARÇAL, 1991; SARUBBO et al., 1999; VANCE-HARROP 2000, 2004; VANCE-HARROP et al., 2003; ALBUQUERQUE et al. 2006; RUFINO et al. 2008). Outras descrevem a combinação entre óleos vegetais e carboidratos como substratos

para a produção de biossurfactantes (DAVILA et al., 1992; ZHOU, KOSARIC, 1993 e 1995; SARUBBO et al., 2006).

Makkar; Cameotra (2002) sugeriram alguns fatores que poderiam ser enfocados na redução dos custos de produção dos biossurfactantes: microrganismos modificados geneticamente; o processo de produção, que pode ser manipulado para redução dos custos operacionais; a utilização de substratos renováveis, como fonte nutritiva para os microrganismos; os processos de recuperação dos biossurfactantes podem ser substituídos por técnicas simples. Os métodos de recuperação mais comuns são as extrações com solventes, como clorofórmio-metanol, butanol, acetato de etila, pentano, hexano, ácido acético ou precipitação ácida. Contudo, esses métodos de recuperação podem ser substituídos por métodos mais simples, como centrifugação, cristalização, adsorção e ultra-filtração (COOPER et al., 1981).

Considerando as inúmeras propriedades e a gama de aplicações dos biossurfactantes, o aprimoramento das técnicas existentes, bem como o desenvolvimento de novas estratégias de produção, através de pesquisas que permitam a redução dos custos de produção e a obtenção de altos rendimentos, será possível identificar o uso em potencial dos biossurfactantes a nível industrial e competitivo em todo o mundo (DELEU, PAQUOT, 2004).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme Microb Technol**, 27, p.749-754. 2001.

ALBUQUERQUE, C.D.C.; FILETI, A.M.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Neural network based software sensors: application to biosurfactant production by *Candida lipolytica*. **Process Biochemistry**, 41, p. 1272-1275. 2006.

AMEZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO H.M.; ESPARZA-GARCIA F.; RÍOS-LEAL E.; RODRÍGUEZ-VAZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, 98, p. 237-240. 2006.

ANGELOVA, B.; SCHMAUDER, H-P. Lipophilic compounds in biotechnology-interactions with cells and technological problems. **J. Biotechnol**. 67, p.13-32. 1999.

ARAGÃO, V.O.; ROCHA, L.L.; ANGELINA, A.L. ; PAES, F.A.; HISSA, D.C.; PINTO, N.W.; MELO, V.M.M.M. ; MARTINS, S.C.S. Leveduras degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC. 57., Anais. Fortaleza: SBPC. 2007.

ARIMA, K. ; KAKINUMA, A. ; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, 31, p. 488-494. 1968.

ATLAS, R.M. Microbial hydrocarbon degradation - bioremediation of oil spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 52, p. 149-156. 1991.

BANAT, I.M.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE, S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 7, p. 80-88. 1991.

BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, 51, p. 1-12. 1995a.

BANAT, IM. Characterization of biossurfactante and their use in pollution removal state of the art (Review). **Acta Biotechnology**, 15, p. 251-267. 1995b.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential Commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, 53, p. 495-508. 2000.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA, M.R.; PASTORE, M.G. Surfactina : propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. 30, 2, p. 01-14. 2007.

BEHRING, J.L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I.O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a

quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492-495. 2004.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 85 p. 1–8. 2004.

BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 38, p. 31-33. 1996.

BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. Characterization of iturin A in antibiotics from various strains of *Bacillus subtilis*. **Journal of Antibiotics**, 29, p.1043-1049. 1976.

BICCA, F.C.; FLECK, L.C.; AYUB, M.A.Z.. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, 30, p. 231-236. 1999.

BIDEL, D.J.; ALY, R.; SHINEFIELD, H.R. Inhibition of microbial adherence by sphinganine. **Can J Micobiol**, 38, p.983-985. 1992.

BILLINGSLEY, K.A.; BACKUS, S.M.; WILSON, S.; SINGH, A.; WARD, O.P. Remediation of PCBs in soil by surfactant washing and biodegradation in wash by *Pseudomonas* sp. LB400. **Biotechnology Letters**, 24, p. 1827-1832. 2002.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 152, p. 41-52. 1999.

BROWN, MJ. Biosurfactants for cosmetic applications. **International Journal of Cosmetic Science**, 13, p. 61-64. 1991.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Shyntesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50, p. 520-529. 1998.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environm. Microbiol*, 48, p.747-750. 1984.

CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, 50, p. 846-850. 1985.

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, 42, p. 408-412. 1981.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 47, p. 173-176. 1984.

DAVILA, A.M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 38, p. 6-11. 1992.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chemie**, 7, p. 641-646. 2004.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbial Mol Rev**, 61, p. 47-64. 1997.

DOONG, R.A.; LEI, W.G. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. **Journal Hazard. Mater**, B96, p. 15-27. 2003.

DUBEY, K.; JUWAKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World J. Microbiol. Biotechnol**, 17, p. 61-69. 2001.

ELLIS, W.D.; PAYNE, J.R, MCNABB, G.D. Treatment of contaminated soils with aqueous surfactants. **U.S.EPA**, 600/2-85/129. 1985.

FLASZ, A.; ROCHA, C.A.; MOSQUERA, B.; SAJO, C. A comparative study of the toxicity of a synthetic surfactant and one produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. **Medical Science Research**, 26, p. 181-185. 1998.

FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresour. Technol**, 75, p. 235-240. 2000.

FRANCY, D.S.; THOMAS, J.M.; RAYMOND, R.L.; WARD, C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **J.Ind.Microbiol**, 8, p. 237-246. 1991.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Zeitschrift fur Naturforschung**, 89, p. 483-496. 2002.

GERARD, J.; LLOYD, R.; BARSBY, T.; HADEN, P.; KELLY, M.T.; ANDERSEN, R. J. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. **J Nat Prod**, 60, p.223-229. 1997.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KÄPPELI, O.; FIECHLER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon sources. **Applied and Environmental Microbiology**, 48, p. 301-305. 1984.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **J. Appl. Microbiol**, 88, p. 379-387. 2000.

HITSATSUKA, K.; NAKAHARA, T.; SANO, N.; YAMADA, K. Formation of a rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. **Agricultural and Biological Chemistry**, 35, p. 686-692. 1971.

HOROWITZ, S.; CURRIE, J.K. Novel dispersants of silicon carbide and aluminum nitride. **J. Dispersion Sci. Technol**, 11, p. 637-659. 1990.

HUE N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 15, p. 203-209. 2001.

ISODA, H.; KITAMOTO, D.; SHINMOTO, H.; MATSUMOTO, M.; NAKAHARA, T. Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukaemia cell line HL60. **Biosci Biotechnol Biochem**, 61, p.609-614. 1997.

JENNEMAN, G.E.; McINERNEY, M.J.; KNAPP, R.M.; CLARK, J.B.; FEERO, J.M.; REVUS, D.E.; MENZIE, D.E. A halotolerant biosurfactant producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. **Developments in Industrial Microbiology**, 24, p. 485-492. 1983.

KAKINUMA, A.; OACHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGINO, H.; ISANO, M.; TUMURA, O.; ARIMA, K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**, 33, p. 669-1672. 1969.

KAO CHEMICAL COMPANY, Australian Patent 8317-555, 1984.

KARANTH, N.G.K.; DEO, P.G.; VEENANADIG, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**, 77, 1, p. 116-126. 1999.

KITAMOTO, D.; YANAGISHITA, H.; SHINBO, T.; NAKANE, T.; KAMISAWA, C.; NAKAHARA, T. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **J Biotechnol**, 29, p.91-96. 1993.

KLECKNER, V.; KOSARIC, N. Biosurfactants for cosmetics. In: Kosaric, N. (ed) Biosurfactants. **Surfactant science series. Dekker, New York**, 48, p. 373-389. 1993.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. **Microbial emulsifiers and de- emulsifiers**. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. eds. Biosurfactants and biotechnology. Surfactant Science Series, v. 25, Dekker, New York, p.247-331, 1987.

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. *Environ. Internat*, 31, p. 155-161. 2005.

LANG, S.; WAGNER, F. **Bioconversion of oils and sugars to glycolipids**. In: Biosurfactants: production, properties, applications. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, p. 205-227. 1993.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, 51, p. 22-32. 1999.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 66, p. 109-120. 1996.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. *Exacta*, v.6, p.209-215, 2008

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**, n. 4, v. 52, p.785-793. 2009.

MAKKAR R.S.; CAMEOTRA S.S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. **Journal of Surfactants and Detergents**, 2, p.371-376. 1999.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 58, p. 428-434. 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin J. Sci Technol**, 27, 3, p. 675-683. 2005.

MARÇAL, M. DO CR. **Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, côco e dendê)**. 1991. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

MASLIN, P.; MAIER, R. Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene in organic-metal co-contaminated soils. **Biorremediation Journal**, 4, p.295-308. 2000.

MAYER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54, p. 625-633. 2000.

MERCADE, M.E.; MANRESA, A.; ROBET, M.; ESPUNY, M.J.; DEANDRES, C.; GUINEA, J. Olive oil Mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresour. Technol**, 43, p. 1-6. 1993.

MERCADE, M.E.; MONLEON, L.; DEANDRES, C.; RONDON, I.; MARTINEZ, E.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, A. Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. **J. Appl. Bacteriol**, 81, p. 161-168. 1996.

MERCADE, M.E.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, A. The use of oil substrates for biosurfactant production. **Recent Res. Dev. Oil. Chem**, 1, p. 177-185. 1997.

MILLER, R.M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal contaminated soils. **Environmental and Health Perspectives**, 103, p. 59-62. 1995.

MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, Y.; IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. **Journal of Bacteriology**, 175(20), p.6459-66. 1993.

MOSES, V. Microbes and oil recovery. **Microbiological Sciences**, 4, p. 305-333. 1987.

MOYNE, A.L.; SHELBY, R.; CLEVELAND, T.E.; TUZUN, S. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**, 90(4), p.622-9. 2001.

MUKHERJEE, S.; PALASHPRYA D.A.; RAMKRISHNA, S.E.N. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, 24, 11, p. 509-515. 2006.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: Kosaric, N. (Ed.), *Biosurfactants, Production, Properties, Applications*. Marcel Dekker, New York, p. 329-371. 1993.

MULLIGAN C.N.; YONG R. N.. GIBBS B.F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. **Environmental progress**, 18, p.50-54. 1999.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **J. Hazard. Mater**, 85, p. 111-125. 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133, p. 183-198. 2005.

MURIEL, J.M.; BRUQU, J.M.; OLFAS, J.M.; JIMENEZ-SANCHEZ, A. Production of biosurfactant by *Cladosporium resinae*. **Biotechnol. Lett**, 18, p. 235-240. 1996.

NASH, J.; TRAVER, R.P.; DOWNEY, D.C. Surfactant enhanced in situ soil Washing. U.S.EPA HWERL. Edilsin. New Jersey. 1987.

NEU, T.; HARTNER, T.; PORA2 K. Surface active properties of viscosin: a peptidolipid antibiotic. **Appl Microbiol Biotechnol**, 32, p.518-520. 1990.

NIELSEN, T.; CHRISTOPHERSEN, C.; ANTHONI, U.; SORENSEN, J. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. **J Appl Microbiol**, 86, p.80-90. 1999.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Braz. J. Microbiol**, 35, 1-2, p. 81-85. 2004.

OCHOA-LOZA, F.J.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Environmental Quality**, 30, p. 479-485. 2001.

OTTO, R.T.; DANIEL, H.J.; PEKIN, G.; MÜLLER-DECKER, K.; FÜRSTENBERGER, G.; REUSS, M.; SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52(4), p.495-501. 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocess and products. **Process Biochem**, 35, p. 1153-1169. 2000.

PATEL, M.N.; GOPINATHAN, K.P. Lysozyme sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, 52, p. 1224-1226. 1986.

PERSSON, A.; MOLIN, G.; ANDERSSON, N.; SJOHOLM, J. Biosurfactant yields and nutrient consumption of *Pseudomonas fluorescens* studied in a microcomputer controlled multifermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, 36, p. 252-255. 1999.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51, p. 553-563. 1999.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactante utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 2006.

QUEIROGA, C.L.; NASCIMENTO, L.R.; SERRA, G.E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34, 4, p. 1-10. 2003.

RHAMAN, K.S.; RAHMAN, T.J. ; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R. ; BANAT, I.M.; Ramnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials, **Biotechnology Program**, 18, p. 1277- 1281. 2002.

REISER, J.; KOCH, A. K.; JENNY, K.; KAPPELI, O. *Advances in Applied Biotechnology Series*; Oringer, J.W.; Tillingest, H.S., eds.; Gulf Publishing Company: London, cap. 3. 1989.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; BOSCH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPINY, M. J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, 11, p. 871-874. 1989.

RODRIGUES, L.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 57(4), p.609-618. 2006.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. Surface active polymers from the genus *Acinetobacter*. In: Kaplan DL (ed) Biopolymers from renewable resources. Springer, Berlin Heidelberg New York. p. 281-291. 1998.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI G.M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 23, p. 729-734. 2007.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; BARROS-NETO, B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35, p.907-914. 2008.

SANTA ANNA, L.M.; SORIANO, A.U.; GOMES, C.A.; MENEZES, E.P.; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.G.; PEREIRA JR, N. Remoção de óleo de solos impactados utilizando biotensoativos do tipo ramnolipídeos. XV Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM). Recife-PE. 2005.

SARUBBO, L.A.; MARÇAL, M.C.R.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Comparative study on bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* strains. **Arq. Biol. Technol**, 40, p. 707-720. 1997.

SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**, 45, p. 423-426. 1999.

SARUBBO, L.A.; MARÇAL, M.C.R.; NEVES, M.L.C.; SILVA, M.P.C.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 95, p. 59-67. 2001.

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. **Electronic Journal of Biotechnology**, 9, p. 400-406. 2006.

SARUBBO, L.A.; FARIAS, C.B.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, 54, p. 68-73. 2007.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, 40, p. 2953-2958. 2005.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **J. Biotechnol**, 40, p. 207-217. 1995.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnol**, 22, p.142-146. 2004.

SOBRINHO, H.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 Biochemistry**, 43, p. 912-917. 2008.

STANGHELLINI, M.E.; RAMUSSEN, S.L.; KIM, D.H.; RORABAUGH, P.A. Efficacy of non ionic surfactants in control of zoosporic spread of *Pythium aphanidermatum* in a recirculating hydroponic system. **Plant Dis**, 80, p. 422-428. 1996.

STANGHELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants. Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Dis**, 81, p. 4-12. 1997.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactant. In: Biosurfactants and Biotechnology, eds., Marcel dekker: New York, cap.3. 1987.

TANAKA, Y.; TAKASHI, T.; KAZUHIK, U.; JUN, U.; YASUSHI, U.; CHIBA, S. O. Method of producing iturin A and antifungal agent for profund mycosis. **Biotechnol Adv**, 15, p. 234-235. 1997.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; MICHEL, M.G. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microbiol Letters**, 128, p. 101-106. 1995.

THOMPSON, D.N.; FOX, S.L.; BALA, G.A. Biosurfactants from potato process effluents. **Appl. Biochem. Biotechnol**, 84, p. 917-930. 2000.

UCHIDA, Y.; TSUCHIYA, R.; CHINO, M.; HIRANO, J.; TABUCHI, T. Extracellular accumulation of mono and di succinyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. **Agricultural and Biological Chemistry**, 53, p. 757-763. 1989.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, 276, p. 456-464. 2004.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, 57, p. 1139-1150. 2004.

VAN DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnol. Adv.**, 9, p. 241-252. 1991.

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) – Departamento de Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

VANCE-HARROP, M.H.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, 34, p. 120-123. 2003.

VANCE-HARROP, M.H. **Potencial biotecnológico de *Candida lipolytica* na produção de biossurfactantes, nos processos de remoção e bioissorção do pireno (derivado do petróleo).** 2004. Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

VELRAEDS-MARTINE, M.C.; VANDER MEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J. Physiochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biological interfaces**, 8, p. 51-61. 1996.

VOLLBRECHT, E.; RAU, U.; LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. **Fett/Lipid**, 101, p. 389-394. 1999.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and applications in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Appl Environ Microbiol**, 63, p.44-49. 1997.

WEBER, L.; DÖGE, C.; HAUFE, G.; HOMMEL, ROLF; KLEBER, H. P. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis Apicola*. **Biocatalysis and Biotransformation**, 5, 4, p. 267 – 272. 1992.

ZHOU, Q.H.; KOSARIC, N. Effect of lactose and olive oil on intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. **Biotechnology Letters**, 15, p. 477-482. 1993.

ZHOU, Q-H.; KOSARIC, N. Utilization of canola oil and lactose to product biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 72, p. 67-71. 1995.

ARTIGO I

RUFISAN UM NOVO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP 0988: CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES

**Manuscrito a ser submetido para publicação no:
BIORESOURCE TECHNOLOGY**

RUFISAN UM NOVO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP 0988: CARACTERIZAÇÃO E PROPRIEDADES

Rufino, R.D.^{1,2}; Sarubbo, L.A.^{2,3}; Campos-Takaki, G.M.^{2,3*}

¹Doutorado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil;

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco;

³Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife - Pernambuco, Brasil.

*Corresponding author. E-mail: takaki@unicap.br; galbatakaki@yahoo.com.br

Fax Number: +55-81-321194043

Resumo

Os processos biotecnológicos são onerosos, especialmente para a produção de biossurfactantes. O sucesso da produção dos biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos que utilizem matérias primas de baixo custo. Considerando a importância das características de um biossurfactante para possibilitar sua aplicação industrial, as propriedades do biossurfactante Rufisan produzido por *Candida lipolytica* em meio previamente otimizado foram estabelecidas. A levedura foi cultivada durante 72 horas para determinação das cinéticas de crescimento e de produção. A tensão superficial do líquido metabólico foi reduzida de 55 para 25,29 mN/m. O rendimento do biossurfactante foi de 8,0 g/L e a CMC 0,03%. O biossurfactante foi caracterizado como um lipopeptídeo aniônico, composto por 50% de proteínas, 20% de lipídeos e 8% de carboidratos. O biossurfactante isolado não apresentou toxicidade frente ao repolho (*Brassica oleracea*). As propriedades do Rufisan sugerem seu potencial de aplicação em setores industriais que necessitem utilizar compostos efetivos a um baixo custo.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*; Resíduo industrial; Surfactante; Fitotoxicidade

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais. Esses compostos são formados por estruturas moleculares contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água) (Muthusami et al. 2008), promovendo a redução da tensão superficial e interfacial, conferindo a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (Gautam and Tyagi, 2006; Deleu and Paquot, 2004; Nitschke and Costa, 2007).

A importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado em aumentar a produção desses compostos em decorrência da diversidade de utilizações industriais (Calvo et al. 2009). Os surfactantes podem ser aplicados na agricultura, na indústria alimentícia, nas indústrias farmacêuticas, de higiene, têxtil e de cosméticos (Singh et al. 2007; Barros et al. 2007), embora o maior mercado para essas biomoléculas seja a indústria petrolífera, onde podem ser amplamente utilizados, a recuperação melhorada de petróleo (MEOR – microbial enhanced oil recovery), na remoção e mobilização de resíduos oleosos, na limpeza de tanques de estocagem e na biorremediação (Mukerjee et al. 2006).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, as novas legislações de controle ambiental têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (Mayer and Soberon-Chaves, 2000).

Surfactantes microbianos ou biossurfactantes são metabólitos produzidos principalmente por bactérias e leveduras, embora alguns fungos filamentosos também os produzam (Ron and Rosenberg, 2002; Luna et al. 2009). Os

biossurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade frente à ampla faixa de pH e sob temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas (Singh et al. 2007; Coimbra et al. 2009).

A despeito das vantagens dos biossurfactantes frente aos similares petroquímicos, esses ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros, embora esse custo possa ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes (Gallert and Winter, 2002; Tuleva et al. 2009).

Nesse contexto, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes, uma vez que a escolha do substrato possa representar uma redução de até 30% do custo total do processo (Maneerat, 2005). Resíduos de destilaria (Babu et al. 1996; Dubey and Juwarkar, 2001), soro de queijo (Koch et al. 1988), melaço (Patel and Desai, 1997) e efluente de óleo de oliva (Mercadè et al. 1994), entre outros, têm sido descritos como substratos para a produção de biossurfactantes. Recentemente, Rufino et al. (2008) descreveram a otimização da produção de um biossurfactante por *Candida lipolytica* cultivada em resíduo de refinaria com características promissoras.

Nesse sentido, o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* e avaliado a partir de planejamentos fatoriais, denominado de Rufisan foi caracterizado quanto às suas propriedades químicas visando sua futura aplicação ambiental e/ou industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e manutenção

O microrganismo utilizado foi a *Candida lipolytica* (UCP 0988), pertencente ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco. O microrganismo foi mantido em seu estágio anamorfo a 5°C em meio Yeast Mold Agar (YMA), sendo repicado a cada 15 dias. Quando excluído o ágar, constituiu o meio de crescimento do inóculo, Yeast Mold Broth (YMB).

2.2. Substrato

O substrato utilizado foi o resíduo industrial da refinaria de óleo de soja, constituído por material gorduroso 60%, carboidrato 35%, sódio 2,7%, magnésio 0,08%, potássio 0,063%, zinco 0,004 % (Miranda et al. 1999).

2.3. Meio de produção

Para a produção do biossurfactante foi utilizado o meio otimizado por Rufino et al. (2008), contendo: 0,1% - NH_4NO_3 ; 0,02% - KH_2PO_4 ; 0,02% - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O meio foi suplementado com 6% de resíduo da indústria de óleo de soja e 1% de ácido glutâmico.

2.4. Cinética de crescimento

A cinética de crescimento da *Candida lipolytica* foi determinada utilizando-se alíquotas do líquido metabólico, coletadas ao longo do cultivo para determinação da biomassa; e do pH (Cirigliano and Carman, 1984; Kuyukina et al. 2001).

A determinação da biomassa foi realizada a partir de 50mL do líquido metabólico, centrifugado a 2000 x g (Centrífuga refrigerada Mod. IEC – CENTRA MP4R) durante 20 minutos, sendo a fase superior descartada e o “pellet” celular lavado com água gelada e seco em estufa a 105°C por 24 horas, em frascos de penicilina previamente pesados. Após esse período, a biomassa foi determinada por gravimetria em balança analítica (Mod. AB104/METTLERTOLEDO) (Garcia-Ochoa and Casas, 1999), o pH foi determinado por potenciometria (Potenciômetro perpHect LogRmeter – Mod. 310).

2.5. Cinética de produção do biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988

A cinética de produção do biossurfactante foi determinada utilizando-se 50 mL do líquido metabólico livre de células, coletadas ao longo do cultivo para determinação da tensão superficial e do rendimento de biossurfactante.

2.5.1. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi determinada utilizando o anel de DuNouy em Tensiômetro modelo Sigma 70 (KSV Instruments LTD, Finland) a temperatura ambiente. A tensão superficial é expressa pela unidade mN/m.

2.5.2. Isolamento do biossurfactante

Após o cultivo da *Candida lipolytica*, o líquido metabólico foi filtrado em papel Whatman N° 1 e centrifugado a 2000 x g por 20 minutos (Centrífuga refrigerada Mod. IEC – CENTRA MP4R), liofilizado (Liofilizador Mod. LABCONCO VIDY – FREEZONE 4.5). O filtrado livre de células foi submetido a extração com clorofórmio (1:1 v/v) em funil de separação com capacidade de 500 mL a temperatura de 25°C. Após essa

etapa a fase aquosa foi liofilizada e o rendimento de biossurfactante determinado por gravimetria (Cirigliano and Carman, 1984, 1985).

2.6. Métodos analíticos

2.6.1. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante

A CMC foi determinada automaticamente pela medida da tensão superficial da água destilada com crescentes concentrações de biossurfactante, utilizando o anel de Du Nouy em Tensiômetro modelo Sigma 70 (KSV Instruments LTD, Finland) a temperatura ambiente.

2.6.2. Teste de fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante Rufisan foi avaliada em ensaio estático através da germinação da semente e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*), de acordo com Tiquia et al. (1996). Soluções teste do biossurfactante isolado foram preparadas em água destilada nas concentrações de 60, 30, 3 e 0,3 mg/l. A toxicidade foi determinada em placas de Petri estéreis (10 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman N°1. As sementes foram previamente tratadas com NaClO, sendo 10 sementes simetricamente adicionadas por placa, que foram inoculadas com 5 ml da solução teste a 28°C. Água destilada foi utilizada como controle. Após cinco dias de incubação no escuro, a germinação das sementes, o crescimento da raiz (≥ 5 mm) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{Germinação relativa da semente (\%)} = \left(\frac{\text{nº de sementes germinadas no extrato}}{\text{nº de sementes germinadas no controle}} \right) \times 100$$

*Comprimento relativo da raiz (%) = (média do comprimento da raiz no extrato /
média do comprimento da raiz no controle) x 100*

IG= [(% germinação da semente)x(%crescimento da raiz)]/ 100%

2.6.3. Determinação da composição bioquímica do biossurfactante

A determinação das proteínas do biossurfactante foi realizada utilizando o kit de proteínas totais Labtest Diagnóstica S.A. Brasil. Os açúcares totais foram determinados conforme a metodologia descrita por Dubois et al. (1956). A quantidade de lipídeos presente no biossurfactante foi determinada utilizando clorofórmio:metanol em diferentes proporções (1:1 e 1:2 v/v). O extrato orgânico foi evaporado e o conteúdo de lipídeos determinados por gravimetria (Manocha et al. 1980).

Extração e metilação de ácidos graxos

A composição em ácidos graxos do biossurfactante isolado foi determinada por cromatografia gasosa dos ácidos graxos metilados.

Os ácidos graxos foram convertidos a metil ésteres modificando a metodologia descrita por Shiosaki et al. (2001). Após a extração do biossurfactante, 200 mg foram colocados em tubos de ensaio hermeticamente fechados, suspensos em 2 mL de uma solução de trifluoreto de boro em metanol a 14 % e 2 mL de benzeno. O frasco foi incubado a 60°C “overnight”. Após esse período, adicionou-se 3 mL de água destilada e o tubo foi agitado em vórtex por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 3.500 x g por 10 minutos a temperatura de 4°C. O benzeno foi removido após a

centrifugação e evaporado com nitrogênio. Os metil ésteres de ácidos graxos foram resuspensores em 0,5 mL de hexano e analisados em cromatógrafo a gás.

Cromatografia em fase gasosa

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás Varian modelo CP-3380 equipado com amostrador automático CP-8200, coluna capilar CP SIL 8CB (30m x 25 mm), utilizando gás hélio como carreador. A temperatura do injetor e detector (FID) em 250°C, a temperatura “oven” em 130°C, inicialmente aumentado para 170°C em 1°C/min, para 180°C em 3 °C/min, foram mantidos isotermicamente por 10 min. Os ácidos graxos foram identificados comparando os tempos de retenção dos picos das amostras com os padrões. Quantidades relativas de metil ésteres CFA foram calculados pela integração das áreas dos picos. Foram utilizados como padrões os ácidos graxos: láurico (C12:0), caprílico (C8:0), oléico (C18:1), palmitoléico (C16:1), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), obtidos da Sigma Chemical Company – USA.

2.6.4. Determinação da carga iônica do biossurfactante

A carga iônica do biossurfactante foi determinada pela técnica de Van Oss, (1968); Van Oss and Heck, (1963). Duas fileiras regularmente espaçadas de poços foram feitas em ágar de baixa viscosidade (solução a 1%). Os poços das fileiras inferiores foram preenchidos com a solução do biossurfactante isolado. Cada poço da fileira superior foi preenchido com uma solução de um composto com carga iônica determinada. A substância aniônica utilizada foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02M, enquanto que a substância catiônica foi o cloreto de bário

(BaCl₂), na concentração de 0,05M. O surgimento de linhas de precipitação entre os poços, indicativas do caráter iônico do biossurfactante, foi monitorado durante 48 horas a temperatura ambiente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação da cinética de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante

Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura para obtenção de altos rendimentos de surfactantes (Rufino et al. 2007).

O perfil de crescimento do microrganismo e de produção do biossurfactante Rufisan foi descrito durante 72 horas de cultivo (Figura 1). Observou-se que a máxima produção de biomassa 11 g/L ocorreu após as 50 horas de cultivo.

O início da fase exponencial de crescimento de *Candida lipolytica* UCP0988 foi observado com 4 horas de cultivo, prolongando-se até as 40 horas de cultivo. O pH inicial do meio de cultivo foi 5,5 e ao final com 72 horas de cultivo atingiu valores próximos a 7,0. Bednarski et al. (2004) estudaram a produção de biossurfactante por *Candida antarctica* ATCC20509 e *C. apicola* ATCC96134, utilizando um resíduo da refinaria de óleo, e observaram que a acidez do meio é um importante parâmetro, estando correlacionada com a síntese de biossurfactante do tipo glicolipídeos. Estudos realizados por Cunha et al. (2004) utilizando gasolina como substrato, demonstraram que o pH do meio apresentou valores próximos a 6,0 ao final da fermentação. Os resultados obtidos sugerem que cada microrganismo apresenta um pH específico para o tipo de biossurfactante produzido.

A maior produção de biossurfactante ocorreu na fase exponencial de

crescimento, tendo sido evidenciado através da redução da tensão superficial do meio de cultivo de 50 mN/m para 25,29 mN/m (Figura 1). Os resultados obtidos demonstram que o maior consumo de carboidratos aconteceu durante a fase exponencial e estacionária de crescimento da levedura (resultados não apresentados), bem como a produção do biossurfactante apresentada na figura 1.

A produção de biossurfactante na idiofase (fase estacionária de crescimento) ocorre tendo em vista o microrganismo já ter produzido os metabólitos primários (trofofase), necessários para o seu desenvolvimento, a partir das fontes de carbono solúveis e insolúveis. Os resultados obtidos são apoiados pelos estudos realizados por Sarubbo et al. (1999, 2001), onde foi avaliada a produção de bioemulsificantes por duas linhagens de *Candida lipolytica* UCP 1055 e UCP 1120, utilizando meio suplementado com 5% de óleo de babaçu e 1% de glicose como fonte de carbono, respectivamente. A produção de bioemulsificantes foi observada na fase exponencial de crescimento e no início da fase estacionária. Os resultados obtidos aqui descritos concordam com Thompson et al. (2000), que utilizaram efluentes de batata para produção de um biossurfactante, o surfactin, e a máxima produção de biossurfactante ocorreu na fase estacionária de crescimento.

Kim et al. (1996) observaram uma relação direta entre crescimento celular, produção de surfactante e consumo de carboidratos quando *B. subtilis* foi cultivado em meio sintético. Estudos realizados por Nitschke (2004) demonstraram que a biossíntese de surfactante por *B. subtilis* apresentou algumas diferenças, acumulando biossurfactante durante a fase exponencial e estacionária de crescimento, como foi previamente descrito para outras cepas de *Bacillus* (Vater, 1986).

Em estudos anteriores Shepperd and Mulligan (1987) relataram que a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ocorreu principalmente a partir do final da fase exponencial de crescimento, o que também foi observado neste trabalho.

3.2. Rendimento do biossurfactante

O rendimento do biossurfactante Rufisan produzido em meio de baixo custo por *Candida lipolytica* UCP 0988 foi de 8 g/L ao final das 72 horas de cultivo, observando-se que a produção do biopolímero ocorreu de acordo com a necessidade nutricional do microrganismo. Sarubbo et al. (2007), apresentaram resultados semelhantes para o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* utilizando óleo de canola e glicose como substratos. Estudos realizados por Sobrinho et al. (2008) utilizando dois resíduos industriais como fonte de carbono demonstraram um rendimento de 4,5 g/L de biossurfactante produzido por *C. sphaerica*. Rufino et al. (2007) obtiveram rendimentos de 4,5 g/L para o biossurfactante de *Candida lipolytica* utilizando extrato de levedura e resíduo industrial como substratos.

3.3. Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante

Outra importante propriedade dos biossurfactantes potentes é a habilidade de atuarem na formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas (AMARAL et al., 2006). A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação das micelas. A Concentração Micelar Crítica (CMC) é a mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo.

O biossurfactante Rufisan de *Candida lipolytica* exibiu excelente capacidade de redução da tensão superficial, uma vez que a tensão superficial da água foi reduzida de 71 mN/m para 25,00 mN/m com uma concentração de 0,3 % de biossurfactante (Figura 2). A partir desse ponto, o aumento da concentração da solução do biossurfactante não provocou maiores reduções na tensão superficial da água, indicando que a CMC havia sido atingida nessa concentração. O biossurfactante de *Candida lipolytica* demonstrou maior capacidade de reduzir a tensão do que o biossurfactante de *Candida lipolytica* (32 mN m^{-1}) (Rufino et al. 2007), de *Candida glabrata* (31 mN m^{-1}) (Sarubbo et al. 2006), de *Candida antarctica* (35 mN m^{-1}) (Adamczak and Bednarski, 2000), de *Yarrowia lipolytica* (50 mN m^{-1}) (Amaral et al. 2006) e de *Candida sphaerica* (27,5 mN/m) (Sobrinho et al. 2008).

O biossurfactante Rufisan, produzido nas condições estudadas nesse trabalho, também demonstrou uma CMC muito inferior do que a CMC de outros surfactantes de leveduras descritos na literatura, considerando os valores de 2,5 % encontrados para os biossurfactantes de *Candida lipolytica* (Sarubbo et al. 2007) e *Candida glabrata* (Luna et al. 2009), de 1 % para o biossurfactante de *Candida lipolytica* (Rufino et al. 2007) e valores de 0,08 % para *Candida sphaerica* (Sobrinho et al. 2008).

3.4. Fitotoxicidade do biossurfactante

O índice de germinação (IG), que combina as medidas da germinação relativa das sementes e o crescimento relativo das raízes foi utilizado para avaliar a toxicidade do biossurfactante Rufisan frente ao repolho (*Brassica oleracea*). Considerando que um IG de 80% tem sido utilizado como indicador do desaparecimento da fitotoxicidade (Tiquia et al. 1996), os resultados obtidos

indicaram que as soluções testadas não apresentaram efeito inibitório sobre a germinação das sementes e sobre o alongamento das raízes do repolho, uma vez que IG de 136% foi obtido para a solução do biossurfactante isolado na maior concentração utilizada 60 mg/l. Foi possível visualizar, também, o crescimento de raízes primárias, secundárias e o surgimento de folhas para todas as soluções testadas. O biossurfactante bruto e isolado de *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 cultivada em glicerol também foi testado quanto ao potencial fitotóxico, indicando inocuidade com relação a esse vegetal (Silva, 2009).

3.5. Caracterização bioquímica do biossurfactante

O Rufisan isolado apresentou 50% de proteínas, 20% de lipídeos e 8% de carboidratos em sua constituição. Diferentemente, o Liposan produzido por *Candida lipolytica* utilizando hexadecano como substrato é composto por 83% de carboidratos e 17% de proteínas (Cirigliano and Carman, 1985). Outro biopolímero produzido em laboratório por *Candida lipolytica* utilizando glicose como substrato, apresentou 47% de proteínas, 45% de carboidratos e 5% de lipídeos (Sarubbo et al. 2001) e o bioemulsificante obtido utilizando óleo de babaçu como substrato, apresentou 60% de carboidratos, 23% de proteínas e 11% de lipídeos, demonstrando que o mesmo microrganismo pode produzir diferentes biossurfactantes dependendo do substrato utilizado (Sarubbo et al. 1999). Mais recentemente, o biossurfactante produzido por *Curvularia lunata* utilizando resíduos insolúveis como substrato, apresentou 25% de proteínas e 48% de polissacarídeos (Paraszkiewicz et al. 2002).

Os ácidos graxos presentes no biossurfactante Rufisan foram convertidos a metil ésteres e identificados comparando os tempos de retenção dos picos das

amostras com os padrões. Quantidades relativas foram calculadas pela integração das áreas dos picos.

Os resultados obtidos por cromatografia em fase gasosa (GC) do biossurfactante isolado detectou os ácidos graxos láurico (C12:0), caprílico (C8:0), oléico (C18:1), palmitoléico (C16:1), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), nas concentrações de 75,34%, 7,96%, 6,36%, 4,23%, 3,85%, 2,25%, respectivamente.

Estudos realizados por Amaral et al. (2006) demonstraram a presença dos ácidos graxos: palmítico, esteárico, láurico e oléico no biossurfactante produzido por *Yarrowia lipolytica* quando cultivada em meio contendo glicose como fonte de carbono. Demonstrando assim que a presença de ácidos graxos no biossurfactante independe da presença de uma fonte de carbono rica em lipídeos no meio de produção.

A determinação do caráter aniônico do biossurfactante Rufisan foi determinada através do surgimento de linhas de precipitação ao redor dos poços contendo o composto catiônico Cloreto de Bário ($BaCl_2$), o que não foi observado para o composto aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Sobrinho et al. (2008) para o biossurfactante de *Candida sphaerica* produzido em meio contendo resíduos industriais como substratos.

4. CONCLUSÕES

O lipopeptídeo aniônico denominado Rufisan isolado de *Candida lipolytica* UCP 0988 apresenta uma CMC reduzida. Propriedade que associada à capacidade de redução da tensão superficial sugere a possibilidade de sua utilização em setores industriais, considerando sua eficiência, baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências financiadoras FACEPE, CAPES, CNPq, FINEP, e PRONEX e à UNICAP, pelo uso de suas instalações.

5. REFERÊNCIAS

Adamczak, M., Bednarski, W., 2000. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett.* 22, 313-316.

Amaral, P.F.F., Da Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P., 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 41, 1894-1898.

Babu, P.S., Vaidya, A.N., Bal, A.S., Kapur, R., Juwarkar, A., Khanna, P., 1996. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnology Letters* 18, 263-268.

Barros, F.F.C., Quadros, C.P., Maróstica, M.R., Pastore, M.G., 2007. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova* 30, 01-14.

Bednarski, W., Adamczak, M., Tomasik, J., Plaszczyk, M., 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology* 95,

15-18.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., UAD, I., González-Lopéz, J., 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Science of the Total Environment 407, 3634-3640.

Cirigliano, M.C., Carman, G.M., 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl Environm Microbiol. 48, 747-750.

Cirigliano, M.C., Carman, G.M., 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology 50, 846-850.

Coimbra, C.D., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2009. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. Current Microbiology 58, 245-249.

Cunha, C.D., Rosário, M., Rosado, A.S., Leite, S.G.F., 2004. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. Process Biochemistry 30, 2277-2282.

Deleu, M., Paquot, M., 2004. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. Computers Rendus Chimie 7, 641-646.

Dubey, K., Juwarkar, A., 2001. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 61-69.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances – *Analytical Chemistry* Easton 28, 350-356.

Gallert, C., Winter, J., 2002. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. *Review Article* 89, 483-496.

Garcia-Ochoa, F., Casas, J.A., 1999. Unstructured Kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology* 25, 613-621.

Gautam, K.K., Tyagi, V.K., 2006. Microbial Surfactants: a review. *Journal of Oleo Science* 55, 155-166.

Kim, S.H., Lim, E.J., Choi, K.S., Jeong, Y.K., Jang, K.L., Lee, T.H., 1996. Emulsifying agent production by *Acinetobacter* sp. *BE-254*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 206-212.

Koch, A.K., Reiser, J., Kappeli, O., Fiechter, A., 1988. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production. *Biotechnology* 51, 35-1339.

Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, M.I., 2001. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods* 46, 149-156.

Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2009. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 785-793.

Maneerat, S., 2005. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 27, 675-683.

Mayer, R.M., Soberon-Chavez, G., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: byosynthesis and potential applications. *Applied Micobiology and Biotechnology* 54, 625-633.

Manocha, M.S., San-Blas, G., Centeno, S., 1980. Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. *J. General. Microbiol.* 117, 147-154.

Mercade, M.E., Manresa, M.A., 1994. The use agroindustrial by-products for biosurfactant production. *Journal of the American Oil Chemists Society* 71, 61-64.

Miranda, O.A., Salgueiro, A.A., Pimentel, M.C.B., Lima Filho, J.L., Melo, E.H.M., Durán, N., 1999. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technol.* 69, 145-147.

Mukerjee, S., Das, P., Sen, R., 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. Trends in Biotechnology 24, 509-515.

Muthusami, K., Gopalakrishnan, S., RAVI, T.K., Sivachidambaram, P., 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. Current Science 94, 736-747.

Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., 2007. Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science & Technology 18, 252-259.

Nitschke, M., 2004. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. Doutorado. 88p.

Paraszkiewicz, K., Kanwal, A., Pdlugonski, J., 2002. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata* growth and product characterization. Journal of Biotechnology 92, 287-294.

Patel, R.M., DESAI, A.J., 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letters in Applied Microbiology 25, 91-94.

Ron, E.Z., Rosenberg, E., 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Current Opinion in Biotechnology 13, 249-252.

Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2007. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 729-734.

Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Barros-Neto, B., Campos-Takaki, G.M., 2008. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 907-914.

Sarubbo, L.A., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., 1999. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Canadian Journal of Microbiology* 45, 423-426.

Sarubbo, L.A., Marçal, M.C., Neves, M.L.C., Silva, M.P.C., Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., 2001. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95, 59-67.

Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., 2006. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP1002. *Electronic Journal of Biotechnology* 9, 400-406.

Sarubbo, L.A., Farias, C.B.B., Campos-Takaki, G.M., 2007. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology* 54, 68-73.

Sheppard, J.D., Mulligan, C.N., 1987. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 27,110-116.

Shiosaki, R.K., Okada, K., Gusmão, N.B., Nigam, P., Falcão, P.S., Silva, N.H., Fukushima, K., Miyaji, M., Campos-Takaki, G.M., 2001. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. *Rev. Iberoam. Micol.* 18, 123-127.

Silva, G.P., MACK, M., CONTIERO, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances* 27, 30-39.

Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25, 99-121.

Sobrinho, H.B.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Campos-Takaki, G.M., Leite, L.F.C., Sarubbo, L.A., 2008. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry* 43, 912-917.

Thompson, D.N., Fox, S.L., Bala, G.A., 2000. Biosurfactants from potato process effluents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84, 917-930.

Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y., Hodgkiss, I.J., 1996. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.* 93, 249–256.

Tuleva, B., Christova, N., Cohen, R., Aantonova, D., Todorov, T., Stoineva, I., 2009.

Isolation and characterization of trehalose tetraester biosurfactants from a soil strain *Micrococcus luteus* BN56. Process Biochemistry 44, 135-141.

Van Oss, C.J., 1968. Specifically impermeable precipitate membranes formed through double diffusion in gels: behavior with complex forming and with simple systems. J. Colloid. Interface. Sci. 27, 684-690.

Van Oss, C.J., Heck, Y.S.L., 1963. Interprétation qualitative et quantitative de la precipitation par double diffusion. Revue d'immunologie 27, 27-41.

Vater, J., 1986. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. Progress in Colloid Polymer Sciences 72, 12-18.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cinética de crescimento da *Candida lipolytica* UCP 0988, pH, tensão superficial do líquido metabólico e rendimento do biossurfactante obtido em meio de baixo custo

Figura 2 Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988 em meio de baixo custo

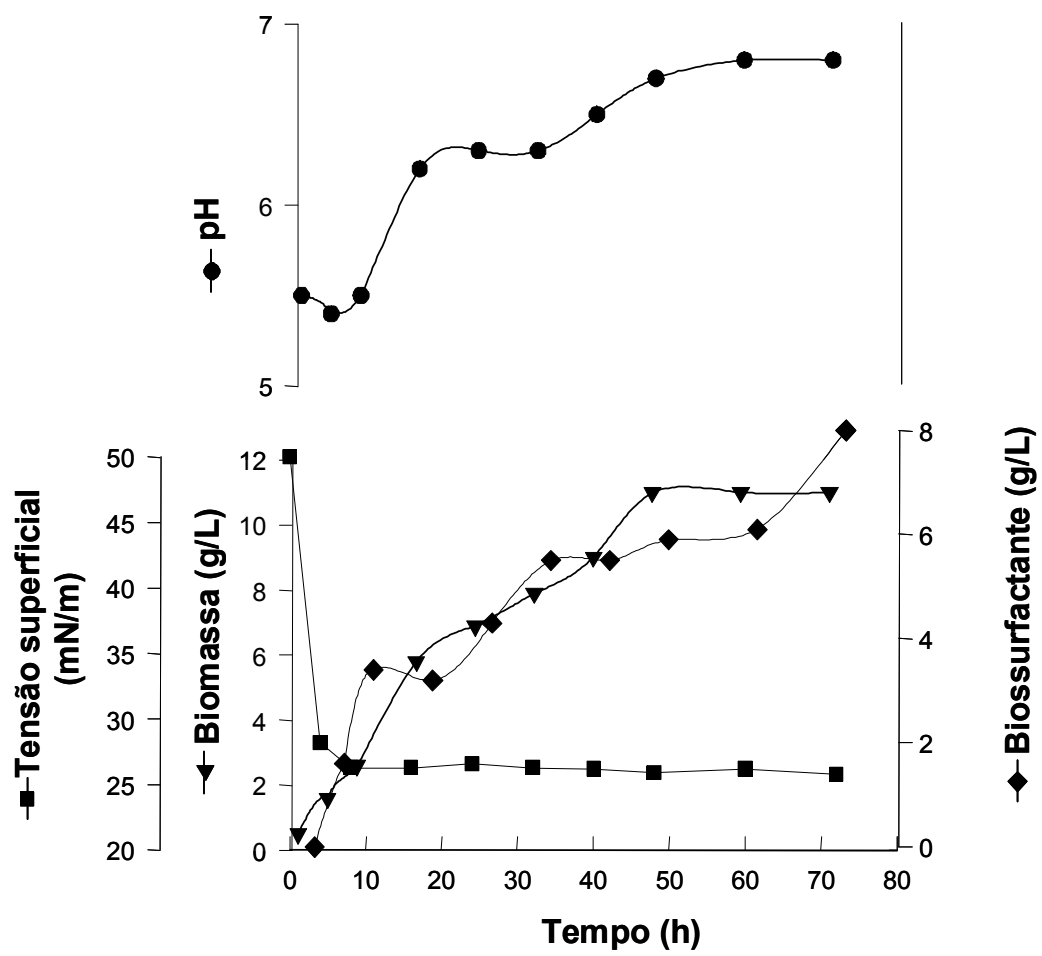


FIGURA 1

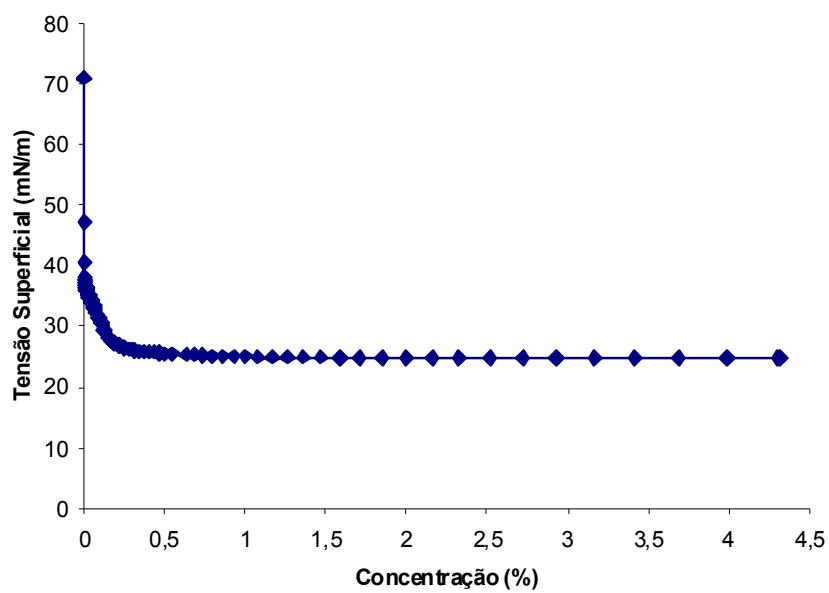


FIGURA 2

ARTIGO II

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO E ANTI-
ADESIVO DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR *CANDIDA*
LIPOLYTICA UCP 0988**

**Manuscrito a ser submetido para publicação no:
JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY**

**POTENCIAL DE APLICAÇÃO COMO AGENTE ANTIMICROBIANO E ANTI-
ADESIVO DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR *CANDIDA*
LIPOLYTICA UCP 0988**

Raquel D. Rufino^{a,b}, Juliana M. Luna^{b,c}, Leonie A. Sarubbo^{b,d}, Lígia Raquel M.
Rodrigues^e, José Antonio C. Teixeira^e, Galba M. Campos-Takaki^{b,d*}

^a*Pós-graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50.670-420, Recife-Pernambuco, Brasil;*

^b*Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua Nunes Machado, 42, Bloco J, Térreo, Boa Vista, CEP 50050-590, Recife, PE, Brasil;*

^c*Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil;*

^d*Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, Boa Vista, CEP 50050-900, Recife- PE, Brasil;*

^e*Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga, Portugal.*

*Autor para correspondência: Tel.: +55-81-21194044, Fax: +55-81-21194043.
E-mail: takaki@unicap.br

RESUMO

O potencial de aplicação dos biossurfactantes baseia-se nas propriedades de emulsificação, separação, solubilização e redução da tensão superficial desses agentes. Essas propriedades possibilitam a utilização dos biossurfactantes em diferentes indústrias, incluindo a de petróleo, alimentar e de cosméticos. Nos últimos anos, pesquisas desenvolvidas na área médica com biossurfactantes têm demonstrado que esses compostos exibem atividades biológicas promissoras para aplicação na medicina. Nesse sentido, o biossurfactante Rufisan produzido pela *Candida lipolytica* (UCP 0988), obtido do cultivo da levedura em meio formulado com resíduo da indústria de óleo de soja, apresentou uma redução da tensão superficial do meio de cultivo de 50 mN/m para 25,29 mN/m e uma concentração micelar crítica de 3 mg/L. O biopolímero foi testado como agente antimicrobiano e anti-adesivo contra diferentes microrganismos. O biossurfactante isolado após 72 horas de fermentação foi utilizado em concentrações que variaram de 0,75 a 12 mg/L. As maiores atividades antimicrobianas foram obtidas contra as estirpes de *Streptococcus agalactiae*, *S. mutans*, *S. mutans* NS, *S. mutans* HG, *S. sanguis* 12, *S. oralis* J22, para uma concentração superior à concentração micelar crítica do biossurfactante. Adicionalmente, o biossurfactante apresentou atividade anti-adesiva contra a maioria dos microrganismos testados. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que as atividades biológicas do biossurfactante Rufisan o tornam um poderoso candidato para aplicações médicas quer como agente antimicrobiano, quer como revestimento anti-adesivo em dispositivos médicos.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, biossurfactante, atividade antimicrobiana, atividade anti-adesiva

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos microbianos que exibem altas atividades superficiais e emulsificantes. Eles incluem uma grande variedade de estruturas, como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexo polissacarídeos-proteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros^{1,2}. Existem diversas propriedades e funções fisiológicas para os diferentes grupos de biossurfactantes. Essas moléculas podem ser produzidas de forma específica, de acordo com a área de aplicação, através da alteração do tipo de substrato ou das condições de crescimento^{3,4}. Devido à baixa toxicidade, aceitabilidade, produção em larga escala e seletividade, esses biopolímeros apresentam um grande potencial de utilização na medicina, área pouco explorada para a utilização desses agentes de superfície^{5,6}.

A maioria dos biossurfactantes é considerada como metabólito secundário, e pode atuar facilitando o transporte de nutrientes, a interação do microrganismo com o hospedeiro ou como agente biocida. As funções dos biossurfactantes incluem o aumento da área superficial, a biodisponibilidade dos substratos insolúveis em água e a diminuição da formação de biofilmes por bactérias patogênicas⁷.

Por serem moléculas que tendem a interagir entre duas fases em sistemas heterogêneos, em função da natureza anfipática, os biossurfactantes tendem a imobilizar a fase sólida para a interface, formando assim filmes conhecidos como condicionantes, que podem mudar as propriedades da superfície original⁸. Em analogia aos filmes condicionantes sintéticos, os biossurfactantes podem interagir com as interfaces, afetando a adesão e a liberação dos microrganismos patogênicos das superfícies⁹. Alguns biossurfactantes apresentam propriedades adequadas para utilização como agentes antimicrobianos e agentes terapêuticos efetivos, e já tiveram seu potencial de atuação como compostos biologicamente ativos descrito na literatura¹⁰.

Os biossurfactantes também têm a capacidade de atuar na inibição da adesão de microrganismos patógenos nas superfícies sólidas. A adesão dos biossurfactantes nessas superfícies, antes do microrganismo, pode constituir uma nova e efetiva forma de combater a colonização desses lugares por microrganismos, evitando, conseqüentemente, a instalação de processos infecciosos⁷.

Os aspectos legais referentes à poluição ambiental causada por atividades industriais e as regulamentações de saúde ambiental podem ter forte influência sobre a utilização de biossurfactantes em contrapartida aos surfactantes sintéticos,

embora muitas das aplicações dos biossurfactantes dependam especialmente da redução dos custos dos processos de produção, que utilizam substratos caros, com um baixo rendimento em produto isolado¹¹.

Nesse sentido, considerando a escassez dos estudos com biossurfactantes para aplicação na era médica e o potencial do surfactante de baixo custo produzido por *Candida lipolytica*, o presente trabalho teve como objetivo aplicar o Rufisan como agente antimicrobiano e anti-adesivo para o controle da contaminação causada por microrganismos patogênicos a superfícies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e Manutenção

O microrganismo utilizado foi a *Candida lipolytica* (UCP 0988), pertencente ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco. O microrganismo foi mantido em seu estágio anamorfo a 5°C em meio Yeast Mold Agar (YMA), sendo repicado a cada 15 dias. Quando excluído o ágar, constituiu o meio de crescimento do inóculo, Yeast Mold Broth (YMB).

2.2. Meio de Produção

Para a produção do biossurfactante foi utilizado o meio otimizado por Rufino et al.¹². O substrato utilizado foi o resíduo industrial da refinaria de óleo de soja, constituído por material gorduroso 60%, carboidrato 35%, sódio 2,7%, magnésio 0,08%, potássio 0,063%, zinco 0,004 %¹³.

2.3. Isolamento do Biossurfactante

Após o cultivo da *Candida lipolytica*, o fermentado foi filtrado em papel Whatman N° 1 e centrifugado a 2000 x g por 20 minutos (Centrífuga refrigerada Mod. IEC – CENTRA MP4R), liofilizado (Liofilizador Mod. LABCONCO VIDY – FREEZONE 4.5). O filtrado livre de células foi submetido a extração com clorofórmio (1:1 v/v) em funil de separação com capacidade de 500 mL a temperatura de 25°C. Após essa etapa a fase aquosa foi liofilizada e o rendimento de Biossurfactante determinado por gravimetria^{14,15}.

2.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana do Biossurfactante

A atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0998 foi testada contra os seguintes microrganismos: *Lactobacillus casei*, *L. casei* 72, *Lactobacillus reuteri* 104R, *Lactobacillus reuteri* ML1, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* 12, *Streptococcus mutans* NS, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* HG, *Streptococcus oralis* J22 e *Candida albicans*, de acordo com Rodrigues et al.¹⁶

Em placas de 96 poços, todos os poços foram inoculados com 2.0 µl de uma diluição 1:2 de uma cultura crescida *overnight*. Após a incubação, durante 24 h a 37°C, determinou-se a turbidez do conteúdo dos poços a 600 nm¹⁶.

2.5. Determinação da Atividade Anti-adesiva do Biossurfactante

A atividade anti-adesiva do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988 foi testada contra os seguintes microrganismos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* 72, *Lactobacillus reuteri* 104R, *Lactobacillus reuteri* ML1, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* 12, *Streptococcus mutans* NS, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* HG, *Streptococcus oralis* J22, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Streptococcus salivarius* e *Rothia dentocariosa* de acordo com Rodrigues et al.¹⁷.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade Antimicrobiana do Biossurfactante

Alguns biossurfactantes, além de suas propriedades detergentes, podem apresentar, em baixa concentração, forte ação desestabilizante de membranas e assim, conferir propriedade antimicrobiana¹⁸. Os dois biossurfactantes mais estudados, o raminolípídeo e a surfactina, foram primeiramente descritos na literatura em 1949 e 1968, respectivamente, por apresentarem estas características¹⁹.

A tabela 1 mostra a porcentagem de inibição de crescimento obtida para diferentes microrganismos utilizando o biossurfactante Rufisan produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988. A atividade antimicrobiana foi determinada para várias

concentrações do biossurfactante bruto (0,75 a 12 mg/L – 4 x CMC), para uma variedade de linhagens de bactérias e leveduras.

O biossurfactante utilizado no presente estudo não apresentou inibição efetiva contra as linhagens de *Lactobacillus* estudadas, mostrando uma inibição de 32,1% no crescimento do *L. reuteri* ML1 quando sua máxima concentração (12 mg/L – 4 x CMC) foi utilizada. Esse resultado pode ser promissor, pois o *Lactobacillus* é um microrganismo que faz parte da microbiota natural do organismo humano e pode ser utilizado como um microrganismo probiótico efetivo²⁰.

As maiores atividades antimicrobianas do biossurfactante foram apresentadas contra as linhagens de *Streptococcus*. Dentre elas, observaram-se valores de 46%, 48%, 58%, 62,8% e 64,9% para as bactérias Gram-positivas, *S. mutans* NS, *S. sanguis* 12, *S. mutans*, *S. oralis* J22 e *S. mutans* HG, respectivamente, nas maiores concentrações de Biossurfactante utilizadas. Esses resultados demonstram que a função antimicrobiana, específica contra espécies de *Streptococcus*, do Rufisan está diretamente relacionada à concentração utilizada, sendo assim, o mesmo apresenta efetividade quando utilizado em concentrações a partir de 6 mg/L, duas vezes acima da CMC. Esse valor é bastante promissor, quando comparado aos valores de concentração apresentados na literatura, uma vez que o biossurfactante foi utilizado na sua forma bruta.

Os demais microrganismos estudados não apresentaram inibição considerável no seu crescimento, independentemente do aumento das concentrações do Biossurfactante, com valores em torno de 5%, 15%, 16% e 18% para *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, respectivamente. De acordo com a literatura, as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos Biossurfactantes do que as bactérias Gram-negativas, que são inibidas fracamente ou não são inibidas^{21,22}.

Os resultados obtidos são semelhantes aos observados por Rodrigues et al.¹⁰, onde foi mostrado que frações purificadas do biossurfactante são agentes antimicrobianos, mas, dependendo do microrganismo, elas apresentam diferentes concentrações efetivas. Por outro lado, outras frações desse Biossurfactante não apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *C. albicans* até a mais alta concentração testada¹⁰.

Thimon et al.²³ descreveram outro biossurfactante com atividade antifúngica chamado de iturina, um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* que afeta a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras. Velraeds-Martine et al.²⁴

relataram a inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas por um biossurfactante produzido por *Lactobacillus*. Os autores sugeriram o desenvolvimento de agentes anti-adesivos para uso em cateteres visando diminuir a formação de biofilmes.

Lang et al.²¹ estudaram a atividade antimicrobiana do soforolípido produzido por *Torulopsis bombicola*, do raminolípido produzido por *Pseudomonas* sp., do trealoselípido produzido por *Rhodococcus erythropolis* e do celobioselípido produzido por *Ustilago maydis*, tendo como microrganismos teste *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Esses dois microrganismos não sofreram qualquer efeito de inibição em seu crescimento quando em contato com os biossurfactantes acima citados, assim como aconteceu com os biossurfactantes denominados B9 e B9S produzidos por *Planococcus citreus*²⁵.

Kitamoto et al.²² citam em seu trabalho a atividade antimicrobiana do manosileritritolípido produzido por *Candida antarctica*, do soforolípido produzido por *C. apicola* e do raminolípido produzido por *P. aeruginosa* contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Todos os Biossurfactantes citados apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos utilizados. Somente o soforolípido não apresentou atividade contra a *C. albicans*.

A atividade antibiótica da surfactina produzida por *B. subtilis* foi testada frente a bactérias e fungos. Todas as bactérias testadas, exceto o próprio *B. subtilis*, demonstraram susceptibilidade ao produto. A *P. aeruginosa* foi a bactéria gram-negativa mais sensível, enquanto que a *E. coli*, a *S. choterasius* e a *S. marcescens* foram inibidas em menor grau. O lipopeptídeo também afetou o crescimento de bactérias gram-positivas, principalmente *M. luteus* e *B. cereus*. O crescimento das leveduras e dos fungos testados não foi afetado pela presença do biossurfactante²⁶.

A atividade antimicrobiana de dois biossurfactantes obtidos de *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A, contra uma variedade de bactérias e espécies de leveduras isoladas de próteses de voz foi testada por Rodrigues et al.²⁷. Eles observaram que os biossurfactantes apresentaram alta atividade antimicrobiana com baixa concentração contra a *Cadida tropicalis* GB 9/9, uma espécie responsável por atuar na falência prematura de próteses de voz. Quando altas concentrações foram testadas, ambos os biossurfactantes foram ativos contra todas as espécies de bactérias e leveduras estudadas. Em outro estudo, Reid et al.^{28,20} enfatizaram a possibilidade dos biossurfactantes produzidos por *lactobacilus*, atuarem na

restauração e manutenção do trato urogenital e intestinal, conferindo proteção contra patógenos, e sugeriram esses compostos como alternativa de um tratamento confiável preventivo no futuro.

Efeitos antibacterianos e antifitovirais de vários raminolipídeos têm sido descritos na literatura^{29,6}. Sete diferentes raminolipídeos foram identificados em culturas de *Pseudomonas aeruginosa* AT10, mostrando excelentes propriedades antifúngicas³⁰.

Golubev et al.³¹ relataram a produção de um fungicida extracelular glicolipídico, termoestável, resistente à ação da protease e de baixa massa molar pela levedura *Pseudozyma fusiformata* (Ustilaginales). Este fungicida foi efetivo contra 80% das 280 leveduras e espécies semelhantes testadas sob condições de acidez (pH 4,0) à temperatura de 20-30°C³². Os glicolipídeos purificados aumentaram a não especificidade da permeabilidade da membrana plasmática em células sensíveis, resultando na formação de ATP.

A primeira evidência clínica do *Lactobacillus*, no trato vaginal com posterior infecção oral, foi descrita por Reid et al.²⁰ e, embora apenas um limitado conjunto de linhagens tenham tido algum efeito clínico comprovado, existem dados suficientes para sugerir que esta aproximação pode prover uma alternativa para a profilaxia ao tratamento antibiótico da infecção. A utilização de um modelo infectado foi descrita por Gan et al.³³ determinando que a linhagem do *Lactobacillus fermentum* RC 14 e seu biossurfactante secretado reduziram as infecções associadas a implantes cirúrgicos, que foram causadas por *Staphylococcus aureus*, através da inibição do crescimento e redução da aderência ao implante cirúrgico. Um estudo *in vitro* do *Lactobacillus plantarum* 299V e *L. rhamnosus* GG mostraram que estas linhagens podem inibir a adesão de *Escherichia coli* nas células epiteliais do intestino³⁴. Estas linhagens, contudo, também foram encontradas produzindo biossurfactantes¹⁰.

Estas observações indicaram que os biossurfactantes também podem conter fatores sinalizantes que interagem com as células hospedeiras e/ou células de bactérias precedendo a inibição das infecções. Todavia, esta possível rota preventiva da adesão microbiana e seu potencial para o desenvolvimento de uma camada biológica anti-adesiva em materiais de implante, é uma aplicação promissora para os biossurfactantes¹⁰.

3.2. Atividade Anti-adesiva do Biossurfactante

Bactérias patogênicas empregam a formação de biofilmes como mecanismo de contra-ataque ao mecanismo de defesa de hospedeiros ou de drogas. Estando protegidas no biofilme, as bactérias patogênicas podem produzir várias substâncias tóxicas, as quais atuam contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Várias doenças, como fibrose cística, por exemplo, são causadas por biofilmes. Contudo, a modificação de uma superfície por um composto leva a uma alteração permanente da superfície, de modo que a afinidade da bactéria pela superfície condicionada seja reduzida ou aumentada quando comparada à superfície nativa. Além das atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais dos biossurfactantes, esses compostos também têm provado ser grandes inibidores da adesão microbiana e da formação de biofilmes³⁵.

A atividade anti-adesiva do biossurfactante bruto foi avaliada em algumas concentrações e comparada para uma variedade de linhagens de bactérias e leveduras (Tabela 2).

O biossurfactante bruto apresentou efeito anti-adesivo contra a maioria dos microrganismos testados a partir da mínima concentração utilizada (0,75 mg/L). Os resultados obtidos demonstraram que a efetividade do Rufisan como agente anti-adesivo aumenta com o aumento da sua concentração.

Para os microrganismos do gênero *Lactobacillus* percentuais com valores em torno de 81% de anti-adesão foram observados para as menores concentrações utilizadas (0,00075 g/L). Mas uma especificidade de ação maior foi observada contra o *L. casei* com valores de 91% e 99% de anti-adesividade a partir da mínima concentração de biossurfactante.

Inibições baixas foram apresentadas para as linhagens de *S. epidermidis* e *E. coli*, com valores de 27% e 21%, respectivamente, para as máximas concentrações utilizadas. Para todos os demais microrganismos utilizados os valores de antiadesividade foram satisfatórios, com valores acima de 45% de anti-adesão.

Resultados promissores na utilização de biossurfactante como agente anti-adesivo também foram observados por Pratt-Terpstra et al.³⁶ para o biossurfactante liberado por *S. mitis* que reduziu a adesão de *S. mutans*. Similarmente, *L. fermentum* RC-14 libera compostos surfactantes que podem inibir a adesão de bactérias uropatogênicas, incluindo *Enterococcus faecalis*³⁷.

Testes de atividades anti-adesivas foram realizados por Das et al.³⁵ para o biossurfactante bruto produzido por *Bacillus circulans*. A atividade anti-adesiva

demonstrou ser dependente da concentração do biossurfactante e do microrganismo testado. Até mesmo a menor concentração testada, ou seja, 0,1 g/L, demonstrou grande potencial anti-adesivo contra *E. faecalis* (19%), *K. aerogenes* (15%) e *S. typhimurium* (25%). Quase 100% de inibição da aderência ocorreu a altas concentrações. Achados prévios indicaram que a anti-adesão foi atingida numa faixa compreendida entre 4-72%, a uma concentração de 2,5-40 g/L³⁵.

A adsorção do biossurfactante à superfície altera a hidrofobicidade podendo causar interferência na adesão microbiana e em processos de dessorção^{29,38}. Várias bactérias têm sido reportadas como inibidoras da adesão de outras bactérias, tanto por exclusão, como pelo mecanismo de impedimento estérico. Em contraste, produtos microbianos como Biossurfactantes condicionam a superfície à qual a bactéria irá se aderir, inibindo assim a adesão dessas últimas. Conseqüentemente, eles encontram aplicação na proteção de superfícies de instrumentos cirúrgicos onde a presença de microrganismos é indesejável³⁵.

A prévia cobertura de cateteres uretrais por soluções de surfactina resultou na redução da formação de biofilmes formados por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella entérica*, *E. coli* e *Proteus mirabilis*³⁹. Esses resultados sugerem um grande potencial de aplicação prática contra infecções do trato urinário em pacientes imunodeprimidos.

Adicionalmente, o uso de *Lactobacillus* para prevenção de infecções urogenitais também tem sido extensamente estudado. A função das espécies de *Lactobacillus* no trato urogenital feminino como uma barreira é uma consideração interessante⁴⁰. Esses organismos são conhecidos por contribuírem para o controle da microbiota vaginal por competição com outros microrganismos que se aderem às células epiteliais e pela produção de biossurfactantes. Eles são relatados por inibirem a formação de biofilmes de uropatógenos e leveduras no silicone com a produção de biossurfactante por *Lactobacillus acidophilus*^{41,42}. Heinemann et al.³⁷ demonstraram a liberação de componentes de superfície por *L. fermentum* RC-14 que inibiram a adesão de uropatógenos, incluindo o *Enterococcus faecalis*.

A função dos biossurfactantes em defesa contra as infecções e inflamações no corpo humano já é um fenômeno bem conhecido. O surfactante pulmonar é um complexo de lipoproteínas sintetizadas e secretadas pelas células epiteliais pulmonares para o espaço extracelular, onde age na redução da tensão superficial

na interface ar-líquido das células, representando um fator chave contra as infecções e inflamações celulares⁴³.

Esforços para o desenvolvimento de estratégias que previnam a colonização microbiana das próteses de voz de silicone foram relatadas por Rodrigues et al.^{27,10}. A habilidade dos biossurfactantes obtidos de espécies de *L. lactis* 53 e *S. thermophilus* A, para inibição da adesão de quatro bactérias e duas espécies de leveduras isoladas de próteses de voz foi avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que os biossurfactantes foram efetivos na diminuição do grau de deposição inicial do número de células aderidas após 4h, para todos os microrganismos testados. Reduções acima de 90% no grau de deposição inicial das células foram apresentadas para todas as espécies bacterianas testadas. O biossurfactante obtido de *S. thermophilus* A foi muito efetivo contra *Rothia dentocariosa* GBJ52/2B, que é a única espécie responsável pela falha das válvulas das próteses de voz. O grau de deposição inicial de espécies de leveduras foi extremamente reduzido na presença do biossurfactante. Recentemente, os autores também demonstraram que quando a lavagem das próteses de voz, com uma solução contendo raminolípídeo foi realizada, o grau de deposição e a adesão de uma variedade de bactérias e espécies de leveduras isoladas de próteses de voz foi reduzida¹⁰. Por essa razão, este raminolípídeo pode ser usado como uma solução de detergente de limpeza das próteses de voz, prolongando sua vida útil e beneficiando os pacientes.

4. CONCLUSÕES

O biossurfactante Rufisan pode ser considerado com um agente antimicrobiano e anti-adesivo promissor, dependendo da concentração utilizada, apresentando amplo espectro de ação antimicrobiana principalmente, para as bactérias Gram-positivas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahimou F, Jacques P, Deleu M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb Technol* 2001; **27**: 749-754.

2. Rufino RD, Sarubbo LA, Campos-Takaki GM. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007; **23**: 729-734.
3. Sarubbo LA, Farias CBB, Campos-Takaki GM. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology* 2007; **54**: 68-73.
4. Luna JM, Sarubbo LA, Campos-Takaki GM. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2009; **52**: 785-793.
5. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential Commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology* 2000; **53**: 495-508.
6. Benincasa M, Abalos A, Oliveira I *et al.* Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004; **85**: 1–8.
7. Singh P, Cameotra S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology* 2004; **22**: 142-146.
8. Neu T, Marshall KC. Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *Microbiol Rev* 1996; **60**: 151-166.
9. Neu T, Marshall KC. Bacterial polymers: physicochemical aspects of their interactions at interfaces. *J Biomat Appl* 1990; 107-133.
10. Rodrigues LR, Teixeira J, Van der Mei HC *et al.* Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus* A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2006a; **53**: 105-112.

11. Makkar RS, Cameotra SS. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; **58**: 428-434.
12. Rufino RD, Sarubbo LA, Barros-Neto B *et al.* Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* 2008; **35**: 907-914.
13. Miranda AO, Salgueiro AA, Pimentel MCB *et al.* Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technol* 1999; **69**: 145-147.
14. Cirigliano MC, Carman GM. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environm Microbiol* 1984; **48**: 747-750.
15. Cirigliano MC, Carman GM. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* 1985; **50**: 846-850.
16. Rodrigues LR, Van der Mei HC, Banat I *et al.* Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2006b; **46**: 107-112.
17. Rodrigues LR, Moldes A, Teixeira JA *et al.* Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal* 2006c; **28**: 109-116.
18. Carrilo C, Teruel JA, Aranda FJ, *et al.* Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; **1611**: 91-97.
19. Maier RM. Biosurfactants: evolution and diversity. *Adv Appl Microbiol* 2003; **52**: 101-121.

20. Reid G, Bruce A, Fraser N *et al.* Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med microbial* 2001; **30**: 49-52.
21. Lang S, Katsiwela E, Wagner F. Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Science Technology* 1989; **91**: 363-366.
22. Kitamoto D, Isoda H, Nakahara T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2002; **94**: 187-201.
23. Thimon L, Peypoux F, Michel MG. Effect of the lipopeptide antibiotic iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiological Letters* 1995; **128**: 101-106.
24. Velraeds-Martine MC, Van Der Mei HC, Reid G *et al.* Physiochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Colloids and Surfaces B: Biological interfaces* 1996; **8**: 51-61
25. Matsuura ABJ. Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. 2004. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 82p.
26. Nitschke M, Ferraz C, Pastore GM. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz J Microbiol* 2004; **35**: 81-85.
27. Rodrigues LR, Van der Mei HC, Teixeira J *et al.* Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibit microbial adhesion on silicone rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004; **66**: 306-311.
28. Reid G, Bruce A, Smeianov V. The role of *Lactobacilli* in preventing urogenital and intestinal infections. *Int Dairy* 1998; **8**: 555-562.

29. Bai G, Brusseau ML, Miller RM. Influence of a rhamnolipid biosurfactant on the transport of bacteria through a sandy soil. *Appl Environ Microbiol* 1997; **63**: 1866–1873.
30. Abalos A, Pinazo A, Infante MR *et al.* Physicochemical and anti-microbial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 2001; **17**: 1367-1371.
31. Golubev WI, Kulakovskaya TV, Golubeva W. The yeast *Pseudozyma fusiformata* VKM Y-2821 producing an antifungal glycolipid. *Microbiol* 2001; **70**: 553-556.
32. Kulakovskaya T, Kulakovskaya E, Golubev W. ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. *FEMS Yeast Res* 2003; **3**: 401-404.
33. Gan B, Kim J, Reid G *et al.* *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J Infect Dis* 2002; **185**: 1369-1372.
34. Mack DR, Michail S, Wei S *et al.* Probiotics inhibit enteropathogenic *E.coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999; **276**: 941-950.
35. Das P, Mukherjee S, Sen R. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009; **71**: 183–186.
36. Pratt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ. Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata. *J Coll Interfac Sc* 1989; **129**: 569–574.
37. Heinemann C, Hylckama V, Van Johan ET *et al.* Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **190**: 177–180.

38. Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61**: 47–64.
39. Mirelles JR, Togushi A, Harshey RM. *Salmonella enteric* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; **183**: 5848-5854. 2001.
40. Boris S, Barbés C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect* 2000; **2**: 543-546.
41. Velraeds M, Van Der Mei HC, Reid G *et al*. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *J Med Microbiol* 1998; **47**: 1081-1085.
42. Reid G. *In vitro* testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int Dairy* 2000; **10**: 415-419.
43. Wright JR. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1453-1455.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de inibição de crescimento obtida para diferentes microrganismos utilizando o Biossurfactante Rufisan produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988. Desvio padrão ($\pm$) determinado em triplicata

Tabela 2 - Taxas de inibição microbiana obtidas no ensaio de atividade anti-adesiva do Biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988, em microplaca. O tampão fosfato (PBS) é tido como controle e ajustado para 0%, já que não ocorre inibição da adesão microbiana. Desvio padrão ($\pm$) determinado em triplicata

TABELA 1

Microrganismo	Inibição do crescimento microbiano (%)				
	Biosurfactante (mg/L)				
	0,75	1,5	3	6	12
<i>Lactobacillus casei</i>	4,5 ± 0,02	9,1 ± 0,07	15 ± 0,02	27,2 ± 0,08	28,4 ± 0,05
<i>Lactobacillus casei</i> 72	4,5 ± 0,03	14,2 ± 0,08	18,1 ± 0,06	32,9 ± 0,06	33,7 ± 0,03
<i>Lactobacillus reuteri</i> 104R	5,9 ± 0,07	9,7 ± 0,01	15,5 ± 0,01	24,4 ± 0,05	25,4 ± 0,08
<i>Lactobacillus reuteri</i> ML1	8,2 ± 0,06	11,3 ± 0,02	16,3 ± 0,02	31,1 ± 0,02	32,1 ± 0,02
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19,3 ± 0,06	19,4 ± 0,01	19,8 ± 0,01	22,2 ± 0,05	22,5 ± 0,02
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	10,9 ± 0,03	35,3 ± 0,03	35,8 ± 0,02	35,5 ± 0,02
<i>Streptococcus mutans</i> NS	15,6 ± 0,07	20,1 ± 0,04	23,8 ± 0,13	46,0 ± 0,1	46,4 ± 0,01
<i>Streptococcus sanguis</i> 12	13,7 ± 0,07	21,5 ± 0,04	31,7 ± 0,05	48,1 ± 0,08	48,0 ± 0,01
<i>Streptococcus mutans</i>	22,5 ± 0,02	34,8 ± 0,01	44,6 ± 0,01	58,3 ± 0,01	58,0 ± 0,06
<i>Streptococcus oralis</i> J22	12,8 ± 0,04	13,2 ± 0,03	14,2 ± 0,03	18,7 ± 0,08	62,8 ± 0,06
<i>Streptococcus mutans</i> HG	41,8 ± 0,02	43,1 ± 0,01	55,6 ± 0,04	64,6 ± 0,03	64,9 ± 0,01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	7,9 ± 0,02	10 ± 0,01	11,6 ± 0,01	16,5 ± 0,04
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	1,57 ± 0,06	3,15 ± 0,06	15,1 ± 0,03
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10,1 ± 0,01	12,9 ± 0,07	14,9 ± 0,07	18,1 ± 0,01	18,0 ± 0,06
<i>Candida albicans</i>	0	0	3,1 ± 0,03	5,95 ± 0,01	6,0 ± 0,02

TABELA 2

Microorganismo	Inibição da adesão Microbiana (%)					
	Biosurfactante Bruto (mg/L)					Controle (PBS)
	0,75	1,5	3	6	12	
<i>Lactobacillus casei</i>	91±0,1	91±0,1	99±0,1	99±0,1	99±0,1	0
<i>Lactobacillus casei</i> 72	81±0,0	87±0,0	89±0,0	91±0,0	95±0,0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i> 104R	84±0,2	93±0,2	94±0,2	95±0,2	97±0,2	0
<i>Lactobacillus reuteri</i> ML1	81±0,0	82±0,0	84±0,0	87±0,0	89±0,0	0
<i>Candida albicans</i>	8±0,0	8±0,0	16±0,0	36±0,0	51±0,0	0
<i>Candida tropicalis</i>	45±0,0	62±0,0	66±0,0	73±0,0	91±0,0	0
<i>Escherichia coli</i>	8±0,1	17±0,1	18±0,1	25±0,1	27±0,1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13±0,0	26±0,0	33±0,0	41±0,0	49±0,0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2±0,0	5±0,0	6±0,0	16±0,0	21±0,0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	88±0,0	91±0,0	92±0,0	97±0,0	98±0,0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	80±0,0	81±0,0	81±0,0	84±0,0	96±0,0	0
<i>Streptococcus mutans</i> HG	76±0,1	76±0,1	81±0,1	83±0,1	85±0,1	0
<i>Streptococcus mutans</i>	76±0,1	84±0,1	85±0,1	88±0,1	97±0,1	0
<i>Streptococcus oralis</i> J22	73±0,0	85±0,0	87±0,0	89±0,0	90±0,0	0
<i>Streptococcus sanguis</i> 12	61±0,0	62±0,0	68±0,0	70±0,0	77±0,0	0
<i>Streptococcus mutans</i> NS	91±0,1	95±0,1	96±0,1	98±0,1	99±0,1	0
<i>Streptococcus salivarius</i>	85±0,1	89±0,1	89±0,1	89±0,1	90±0,1	0
<i>Rothia dentocariosa</i>	84±0,2	89±0,2	93±0,2	96±0,2	96±0,2	0

ARTIGO III

**REMOÇÃO DE DERIVADO DE PETRÓLEO ADSORVIDO EM SOLOS PELO
BIOSSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR *CANDIDA LIPOLYTICA* UCP
0988**

**Manuscrito a ser submetido para publicação no:
JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**

REMOÇÃO DE DERIVADO DE PETRÓLEO ADSORVIDO EM SOLOS PELO BIOSSURFACTANTE RUFISAN PRODUZIDO POR *Candida lipolytica*

Rufino, R.D.^{1,3}; Farias, C.B.B.^{2,3}; Ferreira, S.R.M.⁴; Sarubbo, L.A.^{3,5}; Campos-Takaki,
G.M.^{3,5*}

¹Doutorado em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil;

²Mestrado em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-São Paulo, Brasil.

³Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil.

⁴Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil.

⁵Departamento de Química, Universidade Católica de Pernambuco, Recife-Pernambuco, Brasil.

*Corresponding author. E-mail: takaki@unicap.br; galbatakaki@yahoo.com.br

Fax Number: +55-81-321194043

RESUMO

A poluição ambiental provocada pelo petróleo e seus derivados tem impulsionado as pesquisas na área da biorremediação, onde a utilização de biossurfactantes para aceleração do processo de transferência dos contaminantes hidrofóbicos e sua posterior degradação pelas células microbianas vem sendo cada vez mais investigada em virtude das propriedades desses agentes microbiológicos. Nesse sentido, o biossurfactante Rufisan, produzido pela levedura *Candida lipolytica* em meio formulado com 6% de resíduo de refinaria de óleo vegetal e 1 % de ácido glutâmico, capaz de reduzir a tensão superficial do meio para valores em torno de 25,29 mN/m foi testado na remoção de óleo lubrificante de motor contido em solos. Para determinar o potencial de aplicação do biossurfactante na biorremediação, utilizaram-se solos de diferentes granulometrias contaminados em laboratório com o derivado de petróleo. Testes de remoção em frascos e em colunas de vidro empacotadas foram realizados. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante bruto Rufisan foi capaz de remover cerca de 30% do óleo de motor contido nos solos através de testes estáticos em coluna, enquanto que o biossurfactante isolado na CMC aplicado a ensaios cinéticos removeu 98% do óleo contido em frasco. O tipo de solo e a concentração do biossurfactante não exerceram influência nos percentuais de remoção, sugerindo a utilização do mecanismo de deslocamento para liberar as gotas de óleo adsorvidas nos solos. Os resultados obtidos demonstram o potencial de aplicação desse agente surfactante como coadjuvante nos processos de descontaminação ambiental.

Palavras-chave: *Candida lipolytica*, Rufisan, Biossurfactante, Petróleo, Remoção de óleos, Solos.

1. INTRODUÇÃO

A poluição dos solos por hidrocarbonetos derivados do petróleo e suas desastrosas conseqüências para o meio ambiente vem incentivando o desenvolvimento de tecnologias de remediação mais compatíveis com o meio ambiente (Urum *et al.*, 2006). Os maiores problemas ambientais resultam de derramamentos acidentais de óleos ou resíduos oleosos. Consequentemente a U.S. EPA tem proposto várias tecnologias para o tratamento dos solos contaminados por hidrocarbonetos derivados do petróleo, incluindo métodos químicos, físicos e biológicos (U.S. EPA, 2001). Um dos métodos mais investigado é a biorremediação, que utiliza a habilidade de degradação natural de plantas ou microrganismos, usualmente fungos ou bactérias, para converter parcialmente os contaminantes em compostos menos tóxicos ou totalmente em gás carbônico e água. Embora a biorremediação seja um método efetivo e ambientalmente compatível, o tempo e os custos necessários para tratamento nesse processo não são viáveis para o tratamento de uma grande quantidade de resíduos. Contudo, alguns métodos tais como a lavagem de solos, utilizados para separação dos contaminantes sem provocar danos químicos ao solo, podem aumentar acentuadamente a velocidade da taxa de biodegradação (Urum *et al.*, 2006). O método de lavagem do solo é rápido e eficiente, apresentando potencial de aplicação na remoção de uma grande quantidade de poluentes (Urum *et al.*, 2004).

A biorremediação de solos e águas também encontra outros obstáculos associados à biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo, uma vez que esses compostos hidrofóbicos se ligam às partículas do solo e apresentam pouca solubilidade em água, o que reduz biodisponibilidade para os microrganismos e limita, consequentemente, a transferência de massa para a biodegradação. Segundo Kuyukina *et al.* (2005), a penetração do óleo através do solo é um processo extremamente complexo incluindo fatores físicos, químicos e biológicos.

A chave do processo para o aumento da biodisponibilidade dos óleos contaminantes é o transporte da carga poluente para a fase aquosa (Mihelcic *et al.*, 1993). Nesse contexto, a utilização de compostos surfactantes surge como alternativa para o aumento da solubilidade dos óleos, permitindo a dessorção e conseqüente solubilização dos hidrocarbonetos, facilitando, assim, a assimilação desses compostos pelas células microbianas (Kuyukina *et al.*, 2005).

Estudos recentes mostram que os surfactantes microbianos, metabólitos produzidos por bactérias e leveduras têm habilidade para solubilizar e mobilizar efetivamente compostos orgânicos adsorvidos no solo (Whang *et al.*, 2008). Alguns surfactantes sintéticos, como o Triton X – 100 e o Tween 80 também apresentam habilidade de aumentar a concentração dos compostos não polares na fase aquosa (Prak *et al.*, 2002). Contudo, o uso de surfactantes sintéticos está associado a efeitos tóxicos e à resistência à biodegradação desses compostos (Cort *et al.*, 2002).

Comparados com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes, em geral, exibem forte compatibilidade ambiental, maior atividade superficial, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (Mulligan, 2005). Por essa razão, os biossurfactantes parecem ser fortes candidatos para utilização na biorremediação de solos contaminados e ambientes aquáticos (Christofi *et al.*, 2002), além de serem produzidos por fontes renováveis como a fermentação microbiana, apresentando assim vantagem química frente aos similares sintéticos.

Nesse trabalho, o biossurfactante Rufisan produzido pela *Candida lipolytica* foi testado quanto a seu potencial de solubilizar um derivado de petróleo através de estudos estáticos e cinéticos utilizando diferentes tipos de solo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Solos

Foram utilizados três solos com diferentes texturas. O primeiro, arenoso, foi coletado na Estação Experimental de Itapirema do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) – Goiana /PE. O segundo, siltoso, foi coletado no município de Abreu e Lima – Recife/PE e o terceiro, argiloso, foi coletado no Alto do Reservatório em Nova Descoberta – Recife/PE. Os dois últimos são solos da Formação Barreira.

Amostras de 5 Kg de cada solo foram coletadas e acondicionadas em sacos de nylon. Em seguida, os solos foram individualmente homogeneizados dividindo-se cada amostra em quatro partes iguais em forma de cruz, misturando-se os quadrantes de cima e de baixo, da esquerda com a direita, dois a dois, e refeito todo o processo até que o solo ficasse com as mesmas características. Após homogeneização, os solos foram deixados em repouso ao ar livre durante quatro dias para secagem e finalmente estocados para uso posterior.

2.2. Fluidos percolantes e contaminante

O biossurfactante Rufisan, obtido em meio otimizado descrito por Rufino *et al.* (2008), foi usado nos testes de remoção. O biossurfactante foi utilizado na forma bruta (líquido metabólico livre de células) e isolado, em soluções na CMC (0,03%) e em concentração três vezes superior à CMC (0,09%). O Tween 80 (mono oleato de sorbitana polioxietileno 20), um surfactante comercial não iônico (CMC de 0,0013%), foi utilizado para fins comparativos, na concentração de 0,03% e a água destilada, como controle.

O óleo lubrificante de motor foi obtido em um estabelecimento de manutenção automotiva localizado na cidade do Recife.

2.3. Caracterização físico-química dos solos

Para a caracterização física dos solos foram realizados os seguintes ensaios: Granulometria (ABNT, 1984a), Limites de Liquidez (ABNT, 1984b) e Plasticidade (ABNT, 1984c), Peso Específico dos Grãos (ABNT, 1984d) e Ensaio de Compactação (ABNT, 1986), obedecendo às recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

A caracterização química dos solos foi realizada no Laboratório de Química do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco conforme a metodologia do Manual de Métodos de Análise de Solos da Embrapa (1997). Foram determinados os valores do pH, em H₂O e KCl 1M, as bases extratíveis Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺), Cálcio (Ca²⁺) e Magnésio (Mg²⁺), a Acidez extratível Alumínio (Al³⁺) e Hidrogênio (H⁺), a Condutividade elétrica no extrato de saturação (CE), e superfície específica. Com base nos resultados da análise química do solo, foram calculados, de acordo com o novo sistema de classificação de solos da Embrapa (1997), a Soma das Bases (S), a Capacidade de Troca Catiônica (CTC ou T), o Grau de Saturação por Bases (V) a Saturação por Alumínio (m) e a Saturação por Sódio e óxidos.

2.4. Preparação dos solos

Os solos utilizados foram destorroados em almofariz, e com o objetivo de atingir uma umidade higroscópica de 9,5%, adicionou-se água de maneira uniforme. Para realização dos ensaios em coluna foram moldados corpos de prova cilíndricos com 5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento. Para obtenção de altos valores de

condutividade hidráulica, os corpos de prova foram moldados com a menor densidade possível.

Após essa etapa, realizou-se a saturação dos corpos de prova com água, para saturar as amostras de forma a garantir a retirada de todo o ar existente nos poros dos solos. Inicialmente, percolou-se um volume de água correspondente a aproximadamente 2x o volume de vazios do solo, para estimular a saída do ar.

2.5. Remoção de óleo motor em colunas empacotadas através de ensaio estático

Colunas de vidro (55 x 6 cm) foram inicialmente preenchidas com cerca de 200g de uma mistura contendo os solos da Formação Barreira, e 20g de óleo lubrificante de motor. Em seguida, a superfície foi inundada por 200 mL das soluções do biossurfactante, sob ação da gravidade. A percolação da solução do biossurfactante foi monitorada em intervalos de 5 minutos ao longo de 24 horas, quando não se observou mais percolação da solução (Robert *et al.*, 1989). As melhores condições de remoção foram selecionadas para ensaios posteriores, realizados em frascos.

2.6. Remoção de óleo motor em frascos através de ensaio cinético

A remoção de óleo motor do solo contaminado foi testada através da saturação de 50 g de solo com 10% do óleo de motor. O solo contaminado em laboratório foi colocado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, adicionando-se 50 mL de água destilada ao frasco controle, e 50 mL das soluções do biossurfactante (bruto, na CMC e em concentração superior a 3 vezes a CMC). Os frascos foram agitados a 200 rpm durante 24 horas a 28°C. Após esse período todo o conteúdo foi centrifugado a 5000 rpm durante 1200 segundos.. O óleo residual foi determinado por gravimetria (Santos *et al.*, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização física dos solos

Os resultados dos ensaios de granulometria e de compactação realizados com energia do Proctor Normal para os três solos estão apresentados na tabela 1. O solo arenoso foi classificado como uma areia siltosa mal graduada (SM-SP) e não

apresentou limite de liquidez e de plasticidade. Os solos siltoso (ML) e argiloso (CL), apresentaram baixa compressibilidade. De acordo com os valores de LP e LL foram classificados como mediantemente plásticos – IP entre 7 e 15 (Caputo, 1988). Segundo Oliveira *et al.* (2004) para solos do grupo CL são esperadas características de baixa permeabilidade e com características ruins de drenagem.

3.2. Caracterização química dos solos

A caracterização química dos solos está apresentada na tabela 2.

O pH de um solo não constitui um valor constante e característico como em soluções aquosas, já que solos são sistemas dinâmicos. Os solos naturais estudados apresentaram pH ácido, sendo o solo siltoso o de maior acidez. A capacidade de troca catiônica (CTC) é obtida, segundo metodologia da Embrapa Solos (1997), pela soma das bases Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} e Na^{+} , que representa o valor S, mais o H^{+} , mais o valor de Al^{3+} extraível. A Capacidade de Troca Catiônica também foi considerada baixa (valor T = CTC < 27cmol_c/kg) nos três solos, indicando a predominância do mineral argílico caulinita. Os valores da Superfície Específica encontrados também confirmaram a presença caulinita. A saturação por base média expressa em porcentagem (valor V) foi superior a 50 % para o solo argiloso, indicando tratar-se de um solo Eutrófico, fértil para a agricultura. Já o solo arenoso e o siltoso apresentaram características distróficas. A condutividade elétrica é uma determinação utilizada na classificação de solos salinos em zonas semiáridas, áreas costeiras e nas interpretações de uso e manejo dos solos para determinação da quantidade de sais presentes. A condutividade elétrica do extrato de saturação foi alta para o solo argiloso. Já o valor da matéria orgânica obtida a partir do carbono orgânico foi baixo nos três solos.

3.3. Caracterização química dos solos após a passagem dos fluidos percolantes

Com a finalidade de avaliar o efeito dos percolantes (líquido metabólico contendo o biossurfactante bruto, biossurfactante isolado na CMC e em concentração três vezes superior à CMC, Tween 80 e água destilada) sobre as características químicas dos solos em estudo, a caracterização química dos três solos após a percolação dos fluidos foi realizada e está apresentada nas Tabelas 3, 4 e 5.

O pH dos solos naturais não sofreu grandes variações com a percolação das soluções do biossurfactante e da água destilada. A maior alteração foi observada com o Tween 80, que acentuou a acidez dos solos.

O valor de S (soma de cátions) foi reduzido pela passagem das soluções do biossurfactante isolado e do Tween nos solos arenosos e siltoso, indicando, provavelmente, a captura desses cátions por esses percolantes.

Com relação ao valor de T (Capacidade de Troca de Cátions), houve um aumento de seu valor após a passagem dos percolantes para o solo argiloso, enquanto que apenas a passagem do líquido metabólico contendo o Rufisan aumentou esse valor acentuadamente nos solos arenoso e siltoso.

A passagem das soluções do biossurfactante isolado aumentou o valor de V (% Sat de Base) dos solos arenoso e siltoso, tornando-os mais fértil, enquanto que os outros percolantes reduziram essa propriedade em proporções variáveis. Por outro lado, o líquido metabólico contendo o biossurfactante bruto foi capaz de aumentar o valor de V no solo siltoso.

3.4. Aplicação do biossurfactante na remoção do óleo de motor adsorvido em diferentes tipos de solos

Em todo mundo, mais de 10 bilhões de toneladas por ano de petróleo são produzidas e estima-se que 0,6% desta produção mundial termine poluindo os oceanos. Nenhuma estimativa comparável foi feita em relação à poluição terrestre por hidrocarbonetos de petróleo. Entretanto, considerando que a maior parte do petróleo é produzida, refinada e utilizada sobre a terra, é de se esperar um valor similar ou maior do que o citado para o ambiente marinho (Borges, 2001).

O baixo nível de disponibilidade dos hidrocarbonetos (baixa solubilidade em água, alta fixação sobre a matriz do solo, e pouca transferência dos poluentes adsorvidos da fase sólida para a fase aquosa) é um dos fatores limitantes no processo de biorremediação em solos contaminados (Volkering *et al.*, 1998).

Uma maneira possível de se aumentar a disponibilidade destes hidrocarbonetos por ação microbiana é a aplicação de surfactantes. A melhora na biodegradação dos COHs (Compostos Orgânicos Hidrofóbicos) pelo uso de surfactantes pode ser vista, principalmente, pela dessorção dos COHs adsorvidos no solo e pelo aumento da solubilidade dos COHs por surfactantes em concentrações iguais ou maiores que o valor da CMC (Ou, 2000).

Dois mecanismos controlam a remoção de contaminantes hidrofóbicos contidos em solos por agentes surfactantes. O primeiro ocorre abaixo da concentração micelar crítica (CMC), onde os monômeros surfactantes aumentam o ângulo de contato entre o solo e o contaminante hidrofóbico, permitindo a separação deste das partículas do solo e o conseqüente deslocamento do óleo. O segundo mecanismo, conhecido como solubilização, ocorre acima da CMC, onde os contaminantes se particionam no centro das micelas surfactantes (Easterling *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2008).

Neste sentido, ensaios de remoção do poluente hidrofóbico óleo lubrificante de motor foram realizados inicialmente em colunas empacotadas (remoção estática) e posteriormente em frascos (remoção cinética), para determinar a efetividade do biossurfactante Rufisan produzido por *Candida lipolytica* em remover o derivado de petróleo adsorvido em três diferentes tipos de solo.

3.4.1 Aplicação do biossurfactante Rufisan na remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos contidos em colunas empacotadas

A tabela 6 mostra os resultados dos experimentos de remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos contidos em colunas empacotadas.

Os percolantes utilizados apresentaram resultados satisfatórios na remoção do composto oleoso. A água foi utilizada como controle, visto que apresenta capacidade de atuar na remoção física de compostos oleosos. O Tween 80 (0,03%) foi utilizado para fins comparativos, visto que é um surfactante sintético amplamente utilizado em testes de remoção de compostos oleosos, como os citados por Lai *et al.* (2009).

Remoções em torno de 30% foram obtidas no ensaio estático. Observou-se que a remoção obedeceu, nos três solos testados, a seguinte ordem crescente: água destilada, Tween 80, líquido metabólico livre de células, biossurfactante na CMC e biossurfactante em concentração três vezes superior à CMC. Embora os resultados obtidos demonstrem que a granulometria dos solos não teve grande influência na ação dos percolantes, uma vez que os percentuais de remoção foram muito próximos comparando-se os três solos estudados, foi possível observar que a maior remoção foi obtida para o solo arenoso, que apresenta uma maior superfície específica e uma maior permeabilidade, como descrito anteriormente nas características físico-químicas dos solos, facilitando assim a interação do

biossurfactante com o solo. Devido à natureza anfipática, o biossurfactante formou agregados micelares com o contaminante, promovendo uma maior remoção.

Os resultados obtidos demonstraram a eficiência do biossurfactante bruto na remoção do óleo de motor, resultado importante considerando que os processos de purificação chegam a representar 60% do custo total do processo.

A literatura descreve alguns resultados de pesquisas com biossurfactantes aplicados à remoção de hidrocarbonetos em colunas empacotadas.

Estudos realizados por Urum *et al.* (2003) demonstraram que a habilidade de mobilização ou solubilização de compostos hidrofóbicos por surfactantes pode ou não variar de acordo com a concentração utilizada. Alguns surfactantes de origem vegetal como a aescina, a lecitina e o tanino não foram capazes de aumentar a solubilização de compostos hidrofóbicos em concentrações superiores à CMC. Contudo, quando raminolipídeos foram utilizados, a solubilidade do óleo aumentou com o aumento da concentração. Um trabalho posterior realizado pelos mesmos autores mostrou a variação das concentrações das soluções de raminolipídeos, entre 0,004 e 0,5%, com o propósito de aumentar a biorremediação de solos contaminados por óleos (Urum *et al.*, 2006).

O líquido metabólico livre de células contendo os isolados de *P. aeruginosa* MTCC7815, MTCC7812 e MTCC8165 cultivados em 2% de glicerol removeu cerca de 49-54% do óleo bruto contido em colunas empacotadas (Bordoloi, 2008).

Concentrações elevadas (2,5 e 5,0 g/l) do biossurfactante isolado da *P. aeruginosa* 57SJ, que apresentou uma CMC de 400 mg/l, foram necessárias para remover 70% de pireno adsorvido em solo com tamanho de partículas de 2 mm (Bordas *et al.*, 2007).

Bai *et al.* (1997) investigaram o potencial do raminolipídeo aniônico isolado de *P. aeruginosa* adsorvido em solo em colunas empacotadas. O biossurfactante foi capaz de remover 84% de hexadecano adsorvido em areia de 20-30 mesh (0,6-0,85 mm), enquanto que 22% de remoção foram obtidos quando areia de 40-50 mesh (0,3-0,42 mm) foi utilizada. A capacidade de remoção do raminolipídeo foi comparada com a capacidade de remoção dos surfactantes sintéticos SDS (dodecil sulfato de sódio) (CMC de 2360 mg/l), também aniônico, e Tween 80 (mono oleato de sorbitana polioxietileno 20) (CMC de 13 mg/l), não iônico, para areia de 40/50 mesh. O SDS (472 mg/l) e o Tween 80 (51 mg/l) removeram 0 e 6% do hexadecano, respectivamente.

Em outra pesquisa, a capacidade do SDS em remover diesel adsorvido em solo contido em coluna demonstrou que, enquanto a água, adicionada como controle, foi capaz de remover 24,7% do diesel, o SDS removeu 97% do combustível (Kalladi *et al.*, 2009).

Lai *et al.* (2009), observaram, de forma semelhante aos resultados aqui obtidos, uma remoção em torno de 35% de óleo utilizando uma solução a 0,2% de Tween 80. Enquanto que Abu-Ruwaida *et al.* (1991) para o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante produzido por *Rhodococcus*, demonstraram remoções de 86 % de óleo bruto residual adsorvido em areia. Uma pesquisa mais recente com um biossurfactante também produzido por *Rhodococcus* cultivado em n-hexadecano revelou a habilidade do polímero em remover 82 % de óleo bruto contido em coluna (Kuyukina *et al.*, 2005).

A habilidade da surfactina de *Bacillus* sp. Em remover querosene adsorvido em solo foi avaliada utilizando testes em coluna, apresentando uma remoção entre 34-62% com uma concentração de 0,1% (Urum *et al.*, 2003). Cameotra e Makkar (1998) demonstraram que o biossurfactante isolado de *Bacillus subtilis* foi capaz de remover 56% do óleo adsorvido em areia contida em coluna, enquanto que os biossurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus* cultivados em resíduos (melaço e soro de queijo) em condições termofílicas removeram cerca de 30 % do óleo contido em coluna (Joshi *et al.*, 2008).

3.4.2 Aplicação do biossurfactante Rufisan na remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos através de ensaio cinético em frascos

A tabela 7 mostra os resultados dos experimentos de remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos contidos em frascos.

Percentuais elevados de remoção de óleo motor foram observados para as soluções contendo o biossurfactante na CMC (0,03%) e em concentração três vezes superior à CMC (0,09%). O tamanho das partículas das amostras dos solos utilizados e o aumento da concentração do biossurfactante isolado, não exerceram grande influência na remoção do poluente.

É possível sugerir que o biossurfactante de *Candida lipolytica* utilizou o mecanismo de deslocamento para liberar as gotas de óleo adsorvidas nos solos, uma vez que o aumento da concentração não provocou um aumento significativo do percentual de remoção do poluente. Esses resultados são satisfatórios sob o

ponto de vista ambiental, já que concentrações elevadas de alguns biossurfactantes provocam efeito tóxico sob a população microbiana nativa do solo (Christofi and Ivshina, 2002).

O líquido metabólico contendo o biossurfactante de *Rhodococcus erythropolis* removeu cerca de 94% de óleo bruto após 120 minutos de agitação a 100 rpm. Após a lavagem, a fase oleosa manteve-se dispersa na fase aquosa, caracterizando o fenômeno de remoção associado ao processo de dispersão e deslocamento (Ciapina *et al.*, 2006).

O biossurfactante designado como JE1058BS, produzido por *Gordonia* n. JE-1058 removeu cerca de 80% do óleo bruto adsorvido em areia (tamanho de partícula de 3-6 mm), quando adicionado numa concentração de 0,004% (Saeki *et al.*, 2009). Já o biossurfactante de *Candida antarctica* demonstrou capacidade de remover cerca de 50% de óleo adsorvido em areia (Adamczac and Bednarski, 2000), enquanto que a solução do biossurfactante isolado de *Candida glabrata* a 2,5 % de concentração removeu cerca de 84 % do óleo de motor adsorvido em areia (Luna *et al.*, 2009).

Biossurfactantes produzidos por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* removeram valores em torno de 49-54% de óleo bruto a temperatura ambiente, 52-57% a 70°C e 58-62% a 90°C (Bordoloi and Konwar, 2008).

Resultados obtidos para o biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* demonstraram que a solução a 0,1 % de concentração foi capaz de remover 65 % do óleo de motor adsorvido ao solo. A solução do surfactante na CMC (0,08%) removeu 55 % do óleo, enquanto que a solução a 0,05% removeu cerca de 30%. O controle, formulado com água destilada, removeu apenas 14,5 % do óleo adsorvido (Sobrinho *et al.*, 2008).

Resultados obtidos por Coimbra *et al.* (2009), utilizando o biossurfactante produzido por *Candida guilliermondii*, demonstraram uma remoção de 23,92% de óleo motor adsorvido em areia padrão (NBR 7214) e de 89,82% do contaminante adsorvido em areia de praia. Já o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* no mesmo estudo apresentou resultados de 63,3% e 86,2% de remoção do mesmo contaminante em areia padrão e areia de praia, respectivamente. Estudos realizados com o biossurfactante produzido por *Candida tropicalis* apresentaram uma remoção de 81,83% de óleo motor adsorvido em areia padrão (NBR 7214) e 95,15% do mesmo contaminante em areia coletada à beira mar (Batista *et al.*, 2010).

CONCLUSÕES

O biossurfactante Rufisan isolado e contido no líquido metabólico livre de células apresenta capacidade de remoção de contaminantes hidrofóbicos contidos em solos sob condições operacionais estáticas e dinâmicas, demonstrando, em consequência, elevado potencial para aplicações industriais e ambientais a um baixo custo, onde poderá ser utilizado na recuperação de óleos, na limpeza de reservatórios e como coadjuvante na biorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Católica de Pernambuco, Brasil. Professor Sérgio Paiva do Laboratório de Química da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Brasil.

REFERÊNCIAS

Abu-Ruwaida, A.S., Banat, I.M., Haditirto, S., Salem, A., Kadri, M, 1991. Isolation of biosurfactant- producing bacteria- Product characterization, and evaluation. *Acta Biotechnologica*, 4: 315-324.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7181: Solos: Análise granulométrica conjunta. Rio de Janeiro, 1984a.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6459: Solos: determinação do limite de liquidez. Rio de Janeiro, 1984b.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7180: Solos: determinação do limite de plasticidade. Rio de Janeiro, 1984c.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6508: Massa Específica dos grãos dos solos. Rio de Janeiro, 1984d.

Adamczak, M., Bednarski, W, 2000. Influence of medium comparation and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*. Biotechnology Letters, 22: 313-316.

Baig, G., Brusseau M.L., Miller, R.M, 1997. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. Journal of Contaminant Hydrology, 25: p.157-170.

Batista, R.M., Rufino, R.D., Luna, J.M., Souza, J.E.D., Sarubbo, L.A, 2010. Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* Applied to the Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil. Water Environment Research, doi:10.2175/106143009X12487095237279. IN PRESS.

Bordas, F., Lafrance, P., Villemur, R, 2007. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. Environmental Pollution, 138: 69-76.

Bordoloi, N.K., Konwar, B.K 2008. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. Colloids and Surfaces B, 63: 73-82.

Borges, R.M.H. Biodegradação em solo argiloso contaminado com petróleo. Dissertação, UFRJ/EQ. 180p. 2001.

Cameotra, S.S., Makkar, R.S, 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, 50: 520-529.

Caputa, H.P. Mecânica dos solos e suas aplicações. LTC Livros técnicos e científicos. Editora S.A. v.1, Rio de Janeiro, 234p.1988.

Ciapina, E.M.P., Melo, W.C., Santa Anna, L.M.M., Santos, A.S., Freire, D.M.G., Pereira Jr, N, 2006. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sol carbon source. Appl. Biochem. Biotechnol, 6: 129-132.

Christofi, N., Ivshina, I.B., 2002. A review: Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. J.Appl.Microbiol, 93:915-929.

Coimbra, C.D., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2009. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. Current Microbiology, 58: 245-249.

Cort, T.L., Song, M.S., Bielefeldt, A.R., 2002. Non ionic surfactant effects on pentachlorophenol degradation. Water Res., 36: 1253-1261.

Easterling, E. R., French, W.T., Hernandez, R., Licha, M., 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. Bioresource Technology, 100: 356-361.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA (1997). Manual de métodos de análise de solo. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisas de Solos. 212p.

Joshi, S., Yadav, S., Desai, A.J., 2008. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. Biochemical Engineering Journal, 41: 122-127.

Khalladi, R., Benhabilesa, O., Bentahara, F., Moulai-Mostefab, N., 2009. Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. Journal of Hazardous Materials, 164: 1179-1184.

Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Makarov, S.O., Litvinenko, L.V., Cunningham, C.J., Philp, J.C., 2005. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. Environ. Int., 31: 155-161.

Lai, C.C., Huang, Y.C., Wei, Y.H., Chang, J.S., 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. Journal of Hazardous Materials, 167: 609-614.

Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2009. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. Brazilian Archives of Biology and Technology, 52: 785-793.

Mihelcic, J.R., Lueking, D.R., Mitzell, R.J., Stapleton, J.M., 1993. Bioavailability of sorbed and separate-phase chemicals. Biodegradation, 4: 141-153.

Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollut., 133: 183-198..

Prak, D.J.L., Pritchard, P.H., 2002. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons dissolved in Tween 80 surfactant solutions by *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505. Can. J. Microbiol., 48: 151-158.

Robert, M., Mercadé, M.E., Bosch, M. P., Parra, J. L., Espiny, M.J., Manresa, M.A., Guinea, J., 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. Biotechnology Letters, 11: 871-874.

Rufino, R. D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2008. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23: 729-734.

Saeki, H., Sasaki, K.M., Komatsu, O., Miura, A., Matsuda, H., 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp strain JE-1058. Biores. Technol., 100: 572-577.

Santos, A.S., Sampaio, A.P.W., Vasquez, G.S., Anna, L.M.S., Pereira Jr., N., Freire, D.M.G., 2002. Evaluation of different Carbon and Nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 98: 1025-1035.

Sharma, Y.C., Singh, B., Upadhyay, S.N., 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. Fuel, 87: 2355–2373.

Sobrinho, H.B.S., Rufino, R.D., Luna, J.M., Salgueiro, A.A., Campos-Takaki, G.M., Leite, L.F.C., Sarubbo, L.A., 2008. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. Process Biochemistry, 43: 912-917.

Urum, K., Pekdemir, T., Copur, M., 2003. Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. Trans IchemE, Part B 81: 203-209.

Urum, K., Pekdemir, T., Copur, M., 2004. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. J. Colloid Interface Sci., 276: 456-464.

Urum, K., Grigson, S., Pekdemir, T., McMenamy, S., 2006. A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. Chemosphere, 62: 1403-1410.

U.S. EPA. Treatment technologies for site cleanup: annual status report . Office of solid waste and emergency response. 10th ed., USA. 2001.

Volkerling, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H., 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation, 8: 401-417.

Whang, L.M., Liu, P.W., Ma, C.C., Cheng, S.S., 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. J. Hazard. Mater., 151: 155-163.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Granulometria, consistência e classificação unificada dos solos

Tabela 2 - Caracterização química dos solos naturais

Tabela 3 – Análise química total do solo arenoso contaminado após a passagem dos percolantes

Tabela 4 – Análise química total do solo siltoso, contaminado por óleo motor, após a passagem dos percolantes

Tabela 5 - Análise química total do solo argiloso, contaminado por óleo motor, após a passagem dos percolantes

Tabela 6 - Remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos, contidos em colunas empacotadas através de ensaio estático

Tabela 7 – Remoção do óleo motor adsorvido em diferentes tipos de solos, contidos em frascos através de ensaio cinético

TABELA 1

Parâmetros	Solos		
Gramulometria (%)	Arenoso	Siltoso	Argiloso
Areia	88	43	50
Silte	3	18	2
Argila	9	39	48
% LP < 2 μ m	8	23	47
Consistência			
Limite de liquidez (LL) (%)	NL	38	40
Índice de plasticidade (IP)	NL	11	13
(%)			
Ia ^a	-	0,48	0,28
Compactação			
Umidade ótima (%)	8,70	14,70	19,00
μ_{dmax}^b (kN/m ³)	18,20	18,40	17,00
Classificação Unificada	SP-SM	ML	CL

^aIa = IP/< 2 μ m - Atividade, ^b μ_{dmax} : peso específico aparente seco máximo

TABELA 2

Determinações	Arenoso	Siltoso	Argiloso
pH em água	6,08	5,2	6,23
Carbono Orgânico (g/Kg)	1,07	0,00	1,11
Matéria Orgânica (g/Kg)	1,85	0,00	1,91
Hidrogênio extraível (H ⁺) (cmolc/kg)	7,70	5,85	7,65
Alumínio Extraível (Al ⁺⁺⁺) (cmolc/kg)	0,40	0,35	0,10
Valor de S (soma de cátions) (cmolc/kg)	4,93	5,80	13,10
Valor de T (Cap. Troca Cátions) (cmolc/kg)	13,03	12,00	20,85
Valor de V (% Sat. de Base)	37,83	48,33	62,82
% Fe ₂ O ₃ no Ext. sulfúrico (g/Kg)	0,50	4,63	5,75
% SiO ₂ na terra fina (g/Kg)	71,20	73,0	69,5
% Al ₂ O ₃ no Ext. Sulfurico (g/Kg)	1,50	13,0	17,1
% água no extrato saturação	39,5	44,2	49,4
Cond. Elétrica no ext. sat. (μS/cm a 25°C)	10	12	460
Superfície específica (m ² /g)	18,4	14,7	14,7

TABELA 3

Determinações	Removedores				
	Água	Líquido Metabólico	Rufisan (CMC)	Rufisan (3xCMC)	Tween 80
pH em água	5,68	6,28	6,60	6,40	5,72
Valor de S (soma de cátions) (cmolc/kg)	12,73	71,37	9,56	9,22	8,24
Valor de V (% Sat. de Base)	0,64	0,91	85,36	83,59	0,54
Valor de T (Cap. Troca Cátions) (cmolc/kg)	20,03	78,42	11,20	10,03	13,24

TABELA 4

Determinação (unidade)	Removedores				
	Água	Líquido Metabólico	Rufisan (CMC)	Rufisan (3xCMC)	Tween 80
pH em água	5,93	5,74	5,00	5,20	4,66
Valor de S (soma de cátions) (cmolc/kg)	4,30	41,30	1,25	1,94	1,20
Valor de T (Cap. Troca Cátions) (cmolc/kg)	11,05	48,05	4,45	4,84	8,20
Valor de V (% Sat. de Base)	0,39	0,66	48,09	40,08	0,15

TABELA 5

Determinação (unidade)	Removedores				
	Água	Líquido Metabólico	Rufisan (CMC)	Rufisan (3xCMC)	Tween 80
pH em água	5,75	6,13	6,2	6,3	5,77
Valor de S (soma de cátions) (cmolc/kg)	34,62	58,98	5,47	5,96	10,00
Valor de T (Cap. Troca Cátions) (cmolc/kg)	42,22	65,93	57,40	57,72	24,35
Valor de V (% Sat. de Base)	82,00	0,89		-	69,81

TABELA 6

Solos	Remoção do óleo lubrificante de motor pelos percolantes (%)				
	Água destilada	Tween 80	Líquido Metabólico	Rufisan (CMC)	Rufisan (3xCMC)
Argiloso	13,5	17,5	30,0	31,2	33,3
Siltoso	10,0	15,2	26,5	30,0	32,2
Arenoso	7,1	12,3	26,0	33,1	37,3

TABELA 7

Solos	Remoção do óleo lubrificante de motor pelos percolantes (%)		
	Água destilada	Rufisan (CMC)	Rufisan (3Xcmc)
Argiloso	40,0	98,0	99,5
Siltoso	40,3	98,1	99,5
Arenoso	41,2	98,0	99,5

ARTIGO IV

APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN NA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS E POLUENTE HIDROFÓBICO CONTIDOS EM SOLO UTILIZADO COMO BARREIRA DE RETENÇÃO DE CHORUME

**Manuscrito a ser submetido para publicação no:
JOURNAL OF ENVIRONMENTAL POLLUTION**

APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE RUFISAN NA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS E POLUENTE HIDROFÓBICO CONTIDOS EM SOLO UTILIZADO COMO BARREIRA DE RETENÇÃO DE CHORUME

Raquel Diniz Rufino^{1,2}; Giullian Inácio Bezerra Rodrigues³; Leonie Asfora Sarubbo^{2,4}; Silvio Romero de Melo Ferreira⁴; Galba Maria de Campos-Takaki^{2,4}

¹Doutorado em Biologia de Fungos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

²Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco;

³Mestrado em Engenharia Civil, Centro de Tecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil;

⁴Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco.

Autor para correspondência: G. M. Campos-Takaki

Tel.: +55 81 21194044; fax: +55 81 21194043.

E-mail addresses: takaki@unicap.br

RESUMO

Este trabalho descreve a aplicação inédita do biossurfactante aniônico Rufisan produzido por *Candida lipolytica* cultivada em resíduo de refinaria de óleo de soja e ácido glutâmico na remoção de metais pesados e óleo lubrificante de motor contidos em solo de Formação Barreira utilizando um permeâmetro de paredes flexíveis. Inicialmente, as características físico-químicas do solo foram determinadas. Em seguida, corpos de prova foram preparados com o solo natural, bem como pela mistura do solo com o óleo lubrificante de motor, para a posterior percolação do biossurfactante. Um corpo de prova percolado inicialmente por chorume e, em seguida, pelo biossurfactante também foi utilizado com a finalidade de observar as interações entre o biossurfactante e o lixiviado de resíduos sólidos urbanos. A condutividade hidráulica medida ao longo da percolação dos fluidos demonstrou que o biossurfactante foi capaz de reduzir acentuadamente a permeabilidade do solo, possibilitando sua aplicação em barreiras reativas. O biossurfactante Rufisan contido no líquido metabólico livre de células foi capaz de remover cerca de 96% de Zn e de Cu e de deslocar e reduzir as concentrações dos metais Pb, Cd e Fe das camadas superficiais do corpo de prova. Cerca de 20% do óleo lubrificante de motor também foram removidos nos testes realizados no permeâmetro com o corpo de prova contendo a mistura do solo compactado com o óleo. Portanto, o Rufisan de *Candida lipolytica* apresenta potencial de aplicação em novas técnicas onde a remoção de metais pesados e de derivados de petróleo adsorvidos em solo seja desejável. Esses resultados demonstram a versatilidade dos biossurfactantes em função da natureza anfipática desses compostos, propriedade que os tornam cada vez mais competitivos e funcionais, com possibilidades reais de utilização nas indústrias e no meio ambiente.

Palavras-chave: Biossurfactante; Solos; Metais; Óleo motor; Chorume; Barreiras reativas

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento exponencial da produção industrial, inúmeros produtos são utilizados e depositados inadequadamente no ambiente, contaminando solos e águas. Existem vários tipos de contaminantes e segundo Sparks (1995), para contaminantes do solo e águas incluem-se espécies inorgânicas como Nitrato e Fosfato, metais pesados como Cádmio, Cromo, Mercúrio e Chumbo, químicos orgânicos, incluindo compostos hidrofóbicos, ácidos inorgânicos e radionuclídeos. No solo natural, estes contaminantes podem não ser completamente degradados, mas transformados em produtos intermediários que podem ser menos, iguais ou mais perigosos do que o composto inicial, bem como podem ser menos ou mais móveis no solo (Burden e Sims, 1998).

A ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) define lixiviado como “líquido produzido pela decomposição de substâncias contidas nos RSU (Resíduos Sólidos Urbanos) que tem como características a cor escura, o mau cheiro e a elevada DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio); constitui-se numa mistura de substâncias inorgânicas, compostos em solução e em estado coloidal e diversas espécies de microrganismos” (ABNT, 2004). A geração de lixiviados em um aterro sanitário se dá devido à percolação da água da chuva que infiltra pela cobertura do aterro e que excede a capacidade que o solo tem de manter retida a água em seus poros (capacidade de campo).

Vários métodos físico-químicos e biológicos, ou a combinação de ambos, são usados no tratamento de lixiviados. Segundo Gomes (2000), o processo biológico permite a biodegradação dos compostos orgânicos presentes no lixiviado pela ação de microrganismos que transformam em substâncias mais simples como água, gás carbônico e metano. O tratamento físico-químico, combinado com um tratamento biológico, consiste em eliminar do lixiviado espécies químicas indesejáveis no efluente final, como metais pesados e componentes orgânicos. Nos tratamentos físico-químicos, por outro lado, as principais técnicas utilizadas são diluição, filtração, coagulação, floculação, precipitação, sedimentação, adsorção, troca iônica, oxidação química, osmose reversa, lavagem com ar, ultrafiltração, oxidação, evaporação natural e vaporização.

Dentre os principais métodos de tratamento de lixiviados, destacam-se as barreiras reativas. Esta técnica, conhecida também por barreiras geoquímicas, consiste em uma forma passiva de tratamento no qual o líquido a ser tratado passa

pelo interior da barreira (ou reatores) que contém um material que proporciona um tratamento específico. É um processo geralmente físico-químico, onde os reatores, em geral, são compostos por solos ou misturas destes com outros materiais reativos.

Originalmente, Barreiras Reativas consistem em uma técnica de remediação de pluma de contaminação do lençol freático subterrâneo. O conceito envolve a instalação de Barreiras Reativas Permeáveis (BRPs) à jusante da fonte de contaminação e na direção transversal ao fluxo da pluma de contaminação (Suthersan, 1996). Desta forma, direciona-se o fluxo da pluma de contaminação através da barreira, promovendo reações que atenuam a carga contaminante. Normalmente, este processo de tratamento é passivo, induzido apenas pela condição natural de fluxo subterrâneo. Por este motivo, a técnica de Barreiras Reativas Permeáveis, se aplicável, constitui-se em uma alternativa de remediação de áreas contaminadas com vantagens econômicas e simplicidade operacional em relação a outras técnicas. O tratamento da pluma de contaminação pode ocorrer por processos físicos, químicos e/ou biológicos promovidos por elementos reativos presentes na barreira reativa.

O foco deste estudo é a utilização da técnica de barreira reativa permeável (BRP) no tratamento do lixiviado gerado no interior de um aterro sanitário. Entre alguns dos mais importantes destes processos incluem-se precipitação, sorção, oxidação/redução, fixação e degradação. Estes processos poderão ocorrer simultaneamente na promoção da remoção dos contaminantes das águas subterrâneas ou na transformação em formas menos tóxicas (Starr e Cherry, 1994; Nobre, 2003). É necessário, assim, conhecer as características do contaminante para selecionar o tipo de elemento reativo mais adequado ao tratamento. Diferentes contaminantes têm comportamentos diferenciados e características próprias o que exige que as barreiras reativas sejam construídas especificamente para cada contaminante.

Esta seleção envolve, além de critérios de eficiência reativa, o custo, a disponibilidade de material, a exeqüibilidade, o subproduto gerado, as condições de coluna da pluma através da barreira, entre outras condicionantes operacionais. Alguns fatores importantes que limitam a aplicação da técnica incluem a profundidade em que ocorre a pluma de contaminação, a densidade do contaminante e a espessura do aquífero. A técnica de BRP aplica-se a profundidades relativamente baixas, pois BRP muito profundas são antieconômicas

devido aos gastos com escavação, mobilização de terra e manutenção da barreira, entre outros. Neste contexto, a permeabilidade da barreira torna-se outro importante fator, devendo a permeabilidade da barreira ser tal que o fluxo através da barreira seja suficientemente lento para que as reações ocorram e, ao mesmo tempo, será maior ou igual ao fluxo hidrológico natural a fim de que a barreira não gere uma redução da velocidade de fluxo natural, o que resultaria no desvio da pluma de contaminação.

Uma série de materiais reativos vem sendo analisada para avaliação do potencial de remediação/degradação de diferentes tipos de compostos, incluindo contaminantes inorgânicos, tais como metais pesados, e contaminantes orgânicos, derivados de petróleo e de solventes industriais (Nobre, 2003). Na confecção dos reatores utilizam-se vários elementos reativos, os quais podem reagir com os contaminantes das águas superficiais para atenuá-los, modificá-los quimicamente ou retê-los por completo. Como exemplos de elementos reativos têm-se zeólitas, bentonitas, sílica gel, ferro com valência zero (Fe^0), resina de troca de íons, carvão ativado, entre outros. Nesse contexto, surge a possibilidade de aplicar biossurfactantes como elemento reativo no tratamento dos contaminantes contidos em barreiras reativas, técnica até então não descrita na literatura.

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. A porção apolar é, freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (Calvo et al., 2009). 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 (Muthusamy et al., 2008). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases.

Considerando que poucas tecnologias podem ser utilizadas no tratamento concomitante de poluentes orgânicos e metais pesados, os biossurfactantes, em função de suas propriedades, podem ser aplicados não só na remoção de

compostos orgânicos hidrofóbicos, como também na remoção de metais pesados, especialmente os aniônicos, que podem capturar os cátions metálicos através de interações eletrostáticas ou complexação, e os hidrocarbonetos pela redução da tensão interfacial e conseqüente solubilização desses na fase aquosa ou através da captura das gotas de óleo no interior de suas micelas (Mulligan et al., 2001).

Nesse sentido, esse trabalho visa avaliar a aplicabilidade do Rufisan, um lipopeptídeo produzido pela levedura *Candida lipolytica* com excelentes propriedades surfactantes (Rufino et al., 2008) no tratamento de contaminantes provenientes de resíduos sólidos urbanos e de óleo lubrificante de motor contido em solo de Formação Barreira.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Solo

Um solo da Formação Barreira foi utilizado nos experimentos. Amostras do solo foram coletadas no município de Abreu e Lima, localizado na Região Metropolitana da cidade do Recife. Amostras de 20 Kg de solo foram coletadas e acondicionadas em sacos de nylon, seco ao ar, quarteado e homogeneizado.

Para os ensaios de condutividade hidráulica, o solo foi peneirado em peneira de 50 mesh (abertura de 0,297 mm), com a finalidade de melhor aproveitamento das propriedades de retenção.

Para a caracterização física do solo foram realizados os seguintes ensaios: Granulometria (ABNT, 1984a), Limites de Liquidez (ABNT, 1984b) e Plasticidade (ABNT, 1984c), Peso Específico dos Grãos (ABNT, 1984d) e Ensaios de Compactação (ABNT, 1986), obedecendo às recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

A caracterização química do solo peneirado foi realizada no Laboratório de Química do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco conforme a metodologia do Manual de Métodos de Análise de Solos da Embrapa (1997). Foram determinados os valores do pH, em H₂O e KCl 1M, as bases extratíveis Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺), Cálcio (Ca²⁺) e Magnésio (Mg²⁺), a Acidez extratível Alumínio (Al³⁺) e Hidrogênio (H⁺), a Condutividade elétrica no extrato de saturação (CE), e superfície específica. Com base nos resultados da análise química do solo, foram calculados, de acordo com o novo sistema de classificação de solos

da Embrapa (1997), a Soma das Bases (S), a Capacidade de Troca Catiônica (CTC ou T), o Grau de Saturação por Bases (V) a Saturação por Alumínio (m) e a Saturação por Sódio e óxidos.

As análises químicas foram efetuadas nas partes de entrada do fluido (topo) e saída do fluido (base) de cada corpo de prova percolado pelos contaminantes. O local do seccionamento, que resultou na divisão entrada e saída, para referida análise, foi definido como o ponto médio ortogonal à sua altura, esta paralela ao fluxo. A descrição dos corpos de prova e sua devida contaminação são mostrados na Tabela 1.

2.2 Fluidos percolantes e contaminante

2.2.1. Biossurfactante

O biossurfactante Rufisan produzido por *Candida lipolytica* (UCP 0988) foi utilizado como removedor dos poluentes em sua forma bruta (Rufino et al., 2008). O Rufisan exibe excelente capacidade surfactante, uma vez que reduz a tensão superficial da água de 71 mN/m para 25 mN/m.

Após fermentação em meio contendo 6% de resíduo de refinaria de óleo de soja e 1% de ácido glutâmico durante 72 horas, o líquido metabólico foi centrifugado a 2 000 g e utilizado como percolante nos experimentos.

2.2.2. Chorume (lixiviado)

O chorume foi recolhido no aterro de resíduos sólidos de Aguazinha, cidade de Olinda, região metropolitana de Recife – PE. O aterro de resíduos sólidos de Aguazinha recebe diariamente, em média, 400 toneladas de resíduos sólidos urbanos, sólidos volumosos (entulhos e raspagens) e resíduos de poda, correspondendo a um total aproximado de 12.000 toneladas/mês. (MARIANO, 2008). A caracterização química do chorume foi realizada nos Laboratórios de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco de acordo com a APHA (1995). O chorume foi utilizado como percolante na mesma quantidade do biossurfactante.

2.2.3. Óleo lubrificante de motor

O óleo lubrificante de motor obtido em um estabelecimento de manutenção automotiva localizado na cidade do Recife foi utilizado como contaminante do solo.

2.3. Preparação das amostras e procedimentos de ensaios

2.3.1. *Mistura solo e óleo lubrificante*

Para a simulação de uma contaminação de óleo lubrificante usado no solo e posterior compactação do corpo de prova S-OL-B com energia do Proctor Normal, foi necessária a homogeneização manual das duas fases. A quantidade utilizada de óleo lubrificante para o ensaio foi determinada em função do peso seco da amostra total de solo, ficando em de 10% da mesma.

2.3.2. *Determinação da condutividade hidráulica*

As condutividades hidráulicas dos solos saturados, percolados por 500 mL de água destilada, chorume e biossurfactante foram determinadas através de permeâmetro de paredes flexíveis, com carga constante, descrito a seguir.

2.3.3. *Permeâmetro de paredes flexíveis*

Os ensaios para determinação da condutividade hidráulica nos corpos de prova foram realizados no permeâmetro de paredes flexíveis (TRIFLEX 2, ELE International, Canada) do laboratório de resíduos sólidos na UFPE. O equipamento utiliza a técnica de carga constante, impondo-se dois tipos de pressão na célula do aparelho (câmara triaxial), e consequentemente à amostra nela contida: a primeira, um gradiente de pressão entre a base e o topo da célula onde está inserido do corpo de prova, e a segunda uma tensão confinante, ortogonal ao fluxo. O corpo de prova dentro da célula é envolvido por uma membrana de látex. Com esta configuração, podem-se variar tanto as medidas de volume percolado, quanto às de tempo do ensaio, gradiente de pressão e pressão confinante. O permeâmetro de parede flexível tem vantagens em relação ao de parede rígida, tais como: controle de tensões principais, saturação através de contra-pressão, medida de saturação pelo parâmetro B – câmara triaxial, transdutor de pressão e os medidores de variação volumétrica. As condutividades hidráulicas foram calculadas através da equação 1, onde k é o coeficiente de condutividade hidráulica (m/s); V o volume percolado pelo corpo de prova (m³); l a altura do corpo de prova paralelo ao fluxo (m); A a área do corpo de prova, ortogonal ao fluxo (m²); ΔP - o gradiente de pressão no ensaio entre a base e o topo (m.c.a) e t o tempo (s).

$$K = (V I) / A \Delta P t$$

Eq. 1

As condutividades hidráulicas com os contaminantes foram medidas fazendo com que a pressão aplicada na base da câmara do equipamento permanecesse nula, gerando consequentemente um fluxo descendente. Tal metodologia foi aplicada devido aos contaminantes não poderem circular pelos medidores de variação volumétrica e válvulas do equipamento. Foram determinadas também, através do equipamento, os adensamentos dos corpos de prova nas tensões de 25, 50, 100 e 200 kPa. Logo após cada ponto de adensamento, foram efetuadas novas determinações de condutividade hidráulica.

As amostras do solo natural e das misturas do solo – óleo foram compactadas estaticamente nas umidades ótimas, de 19 e 13%, respectivamente, e nos pesos específicos secos máximos, ambos de 16 kN/m³. Corpos de prova com altura média de 109 mm e diâmetro médio de 98 mm foram preparados. A saturação das amostras foi atingida por contra-pressão, sendo constatada por meio do parâmetro $\bar{B} = \Delta u / \Delta \bar{\sigma}_3$ (Δu – acréscimo poro-pressão da água e $\Delta \bar{\sigma}_3$ acréscimo e tensão confinante), utilizando-se um transdutor com leitura externa de poro-pressão. Após a saturação, aplicou-se nas amostras uma tensão confinante, $\bar{\sigma}_3$ 120 kPa. Entre cada etapa e após consolidação, determinou-se a condutividade hidráulica. Para estabelecer o fluxo de água, chorume ou biossurfactante na amostra, aplicou-se uma diferença de tensão entre a base e o topo de 5 kPa, quando, então, se mediu o tempo necessário para que um volume de 5.000 mm³ de água atravessasse o corpo de prova, processo repetido até que se obtivesse três intervalos de tempo iguais.

O sistema do permeâmetro é composto de um painel de controle principal e é capaz de testar uma amostra, enquanto funciona como um controlador para outras amostras. O painel aumenta a capacidade do sistema sem duplicar as funções principais.

Devido às peculiaridades de cada percolante, foi necessário ajustar o equipamento a cada um deles para a realização do ensaio de condutividade hidráulica.

No ensaio com água destilada, para o corpo de prova S-AD, utilizado como referência química e física para os demais, não é necessária nenhuma modificação

do equipamento, pois todo o fluido pode passar, sem nenhum desgaste, pelos componentes internos do permeâmetro.

Os contaminantes chorume (S-CH), óleo lubrificante usado junto com biossurfactante (S-OL-B) e chorume junto com o biossurfactante (S-CH-B) não podem percolar por dentro do equipamento, visto sua enorme agressividade com os componentes do mesmo. Dessa maneira, utiliza-se uma tensão de base igual a zero e se percola o contaminante somente através da célula auxiliar do permeâmetro. Em todos os ensaios o solo foi saturado com o respectivo contaminante antes do início das medições de condutividade hidráulica. A exceção se deu no corpo de prova S-OL-B, onde o contaminante foi inserido antes da compactação do solo e a saturação foi feita pelo fluido biossurfactante. A percolação adicional de biossurfactante foi feita com a finalidade de avaliar a descontaminação ocorrida pelo mesmo nos corpos de prova S-OL-B e S-CH-B.

2.3.4. Quantificação dos metais pesados no solo natural e no óleo lubrificante de motor

As determinações do teor de metais das amostras foram realizadas em Espectrômetro de Absorção Atômica em chama (FAAS) multicanal, Varian 220 FS, nas condições especificadas na Tabela 1. Como fonte de radiação foi utilizada uma lâmpada de cátodo multielementar, operando com uma corrente de 10 mA.

2.3.5. Quantificação do óleo lubrificante de motor removido do corpo de prova pela percolação do biossurfactante

A quantidade de óleo removido após a percolação do biossurfactante no corpo de prova S-OL-B foi analisada na seção de saída por extração do óleo removido com hexano e posterior determinação do percentual de remoção por gravimetria.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização física do solo

A utilização de solo como barreira reativa permeável, para o tratamento de remediação “*in situ*” requer, inicialmente, a adequada caracterização do solo. As características físicas, e químicas do solo são importantes para determinar a sua aplicabilidade em barreiras reativas, que pode ser tanto na contenção e

direcionamento do fluxo hidráulico da pluma quanto como elemento componente da parte reativa.

Os resultados dos ensaios de granulometria do solo e de compactação realizados com energia do Proctor Normal são apresentados na Tabela 2.

A distribuição granulométrica indicou uma predominância da fração fina no solo. O solo, de acordo com os valores de IP LL foi classificado como mediamente plástico – IP entre 7 e 15 (Caputo, 1988). O índice de atividade de 0,4 indicou a fração argila inativa. A classificação pelo SUCS (Sistema Unificado de Classificação de Solos) o enquadra como uma argila de baixa compressibilidade (CL).

Após a mistura entre o solo e o óleo, foi realizado um ensaio de compactação. Obteve-se umidade ótima de 13,2% e peso específico seco máximo de 16,9 kN/m³. Notou-se que há uma redução no valor da umidade ótima do solo natural, quando se adicionou o óleo e não houve alteração no valor do peso específico seco máximo do solo. O óleo funcionou como um lubrificante, reduzindo o atrito entre as partículas fazendo com que a mistura solo-óleo tenha o mesmo peso específico seco máximo par a mesma energia aplicada.

3.2. Caracterização química do solo

As características químicas do solo natural estão descritas na Tabela 3. O solo apresenta acidez acentuada, com o pH variando entre 4,04 e 5,20. A diferença entre o pH_{KCl} e o pH_{H2O} é negativa, indicando a presença de argilas silicatadas (Carvalho, 2004). O solo não apresenta matéria orgânica. A capacidade de troca catiônica (T) é baixa (12 cmol_c/kg). A saturação por bases (valor V) é 69,21 % indicando ser o solo fértil para o plantio.

A condutividade elétrica do solo natural é baixa 0,012 µS/cm/25 °C, tendo baixo teor de sal na sua constituição. Considerando os teores do óxido férrico (Fe₂O₃) o solo é de caráter hipoférrico, isto é, solos com teores de óxido de ferro menores que 80g/kg. Os valores de 14,7 m²/g da superfície específica confirmam a presença do mineral caulinita na mineralogia do solo natural.

3.3. Condutividade hidráulica

O coeficiente de condutividade hidráulica é definido como sendo a maior ou menor facilidade com que a água passa através de um meio físico. Os resultados dos ensaios de condutividade hidráulica são apresentados na Tabela 4. A condutividade hidráulica do solo com água destilada tomada por referência neste trabalho é $3,61 \times 10^{-9}$ m/s, típica de argila e excelente para funcionar com barreira impermeabilizante. No caso em estudo, há pequenas variações da condutividade hidráulica do solo quando se fazem percolar outros fluidos. Todas as condutividades são da mesma ordem de grandeza (10^{-9} m/s) exceto no solo misturado com óleo. A relação entre as condutividades do percolante e da água destilada (K_{ip}/K_{ad}) variou de 0,39 a 53,43, sendo maior quando a água percolou no solo misturado com óleo e menor com o biossurfactante.

A condutividade do solo saturado com chorume foi de $1,95 \times 10^{-9}$ m/s, enquanto que ao ser percolado pelo biossurfactante houve uma redução na condutividade chegando a níveis de 10^{-10} m/s.

A condutividade do solo compactado com óleo lubrificante e percolado pelo biossurfactante foi inicialmente de $1,93 \times 10^{-7}$ m/s, ainda na fase de saturação. O óleo misturado ao solo causou, inicialmente, um acréscimo na condutividade quando comparado com o solo natural em água destilada ($3,61 \times 10^{-9}$ m/s) e o biossurfactante foi reduzindo progressivamente o efeito do óleo e a condutividade final após 20 dias de observação foi de $1,43 \times 10^{-9}$ m/s.

Nesse sentido, a condutividade hidráulica demonstrou que o biossurfactante foi capaz de reduzir acentuadamente a permeabilidade do solo, possibilitando sua aplicação como aditivo em barreiras reativas. A natureza iônica do biossurfactante aumentou a atração entre as partículas carregadas, fazendo com que a estrutura do solo se tornasse menos porosa, dificultando assim a percolação dos fluidos.

3.4. Remoção dos metais pesados

Os possíveis mecanismos para a extração de metais pesados por biossurfactantes incluem troca iônica, precipitação-dissolução e associação ao contra-íon. Considera-se que os metais são removidos através da formação de complexos com o surfactante, na superfície do solo, sendo destacados do solo pela redução da tensão interfacial e se associando, conseqüentemente, às micelas surfactantes (Peng et al., 2009). Os surfactantes aniônicos fornecem resultados

satisfatórios uma vez que os cátions dos metais têm afinidade pelos surfactantes negativamente carregados, sendo também possível que o biossurfactante permita uma maior remoção em função de sua capacidade de redução da tensão interfacial (Asçi et al., 2008).

Segundo a literatura, é importante que os biossurfactantes usados no tratamento tenham uma interação mínima com o solo. Em outras palavras, é desejável que a maioria dos biossurfactantes permaneça na fase aquosa. Entretanto, as grandes concentrações de biossurfactante normalmente requeridas para a remoção efetiva de metais pesados em solo se devem à sorção desses ao solo (Asçi et al., 2007; 2008). Logicamente, o comportamento adsorptivo de um biossurfactante irá depender de suas características moleculares, como por exemplo, carga e hidrofobicidade, bem como das características do solo (Asçi et al., 2008).

Nesse sentido, o biossurfactante aniônico de baixo custo, Rufisan, produzido a partir do cultivo de *Candida lipolytica* em resíduo industrial de refinaria de óleo de soja e capaz de reduzir a tensão superficial da água para 25 mN/m foi testado na remoção dos metais pesados contidos nos corpos de prova contaminados com óleo lubrificante de motor e chorume em permeâmetro de paredes flexíveis.

Os ensaios de espectrometria de absorção atômica em chama realizados no solo natural e nos corpos de prova percolados com chorume, com chorume e biossurfactante, como também no solo misturado com óleo lubrificante de motor e percolado pelo biossurfactante estão na Tabela 5. Todas as comparações efetuadas, de acréscimo ou decréscimo de percentuais, foram tomadas com base nos níveis de cada metal em questão no solo natural.

Para o solo misturado com óleo lubrificante de motor e compactado, ao ser percolado pelo biossurfactante, houve uma redução na concentração de ferro em torno de 16,5% na seção de saída e de 50% na concentração de cádmio. Com relação ao zinco, praticamente não houve alteração na concentração desse metal. No caso dos metais cobre e chumbo, houve deslocamento desses metais para a base do solo, aumentando, assim, suas concentrações em 20 e 17%, respectivamente. A percolação do biossurfactante causou a concentração desses metais na base, havendo assim um carreamento desses para a base do corpo de prova.

Para o solo percolado pelo chorume, não se observam alterações das concentrações dos metais do topo em relação à base, exceto com relação ao cobre e ao chumbo, que foram reduzidos em 46 e 13%, respectivamente.

Para o solo percolado pelo chorume e posteriormente pelo biossurfactante, há um acréscimo da concentração de ferro e cádmio na base do corpo de prova em relação ao topo, embora os valores encontrados sejam inferiores às respectivas concentrações desses metais no solo natural. Para o zinco e o cobre, observou-se uma redução das concentrações da base em relação ao topo de 96,2 e 96,8%, respectivamente. Para o chumbo, observa-se que houve um deslocamento desse metal para a base do corpo de prova de 15,4%.

Os resultados mostraram que o biossurfactante mostrou ser eficaz para ser usado na biorremediação principalmente do zinco e do cobre.

A concentração dos metais presentes no solo natural atendeu às recomendações do CETESB (2001), exceto para a concentração de cádmio, que ultrapassou o limite de 0,0005 g/Kg.

Uma vez que não existem relatos descritos na literatura para ensaios semelhantes aos usados nesse trabalho com o biossurfactante de *Candida lipolytica* (UCP 0988), torna-se difícil a discussão desses, embora os percentuais de remoção obtidos possam ser considerados satisfatórios quando comparados aos relatados em outras condições experimentais, uma vez que foi utilizado o líquido metabólico contendo o biossurfactante, ou seja, o biossurfactante bruto, bem como o fato da ação do surfactante ter sido superior à interação solo-contaminante, já que o mesmo foi capaz de remover os metais detectados. É importante destacar que a profundidade da camada do solo exerceu influência nos resultados de remoção.

O surfactante saponina, por exemplo, que apresenta uma tensão superficial de 36 mN/m, foi testado entre 0,1 e 10%, sendo a remoção dos metais pesados contidos no solo proporcional à sua concentração (Hong et al., 2002).

A possibilidade do uso de biossurfactantes na remoção de metais pesados tem sido demonstrada em alguns trabalhos realizados a nível laboratorial. Mulligan et al. (1999) demonstrou a aplicabilidade de biossurfactantes na remoção de metais pesados contidos em solos. Inicialmente, o sofrolipídeo de *Torulopsis bombicola* cultivada em glicose e óleo de soja, com uma CMC de 0,8g/L (0,08%) e capacidade de reduzir tensão superficial para 34 mN/m foi testado. A solução do sofrolipídeo a 4% não removeu o Zn contido no solo, removendo apenas 3% do Cu. Já o

raminolípídeo de *Pseudomonas aeruginosa* produzido em meio mineral contendo 4% de glicose, com uma CMC de 0,003% e tensão superficial de 26 mN/m possibilitou a remoção de 20 e 35% de zinco e cobre, respectivamente, para uma elevada concentração, de 12%, uma vez que a solução do raminolípídeo a 2% removeu apenas 5 e 10% de zinco e cobre, respectivamente. Mulligan *et al.*, (2001) demonstraram o aumento da remoção de Zn quando a surfactina a 2% foi usada em combinação com uma base.

Daharazma e Mulligan (2007) observaram que os percentuais de remoção dos metais pesados em solo aumentaram linearmente com o aumento da concentração do raminolípídeo testado. A utilização de 5% do raminolípídeo removeu 37% de Cu, 7,5% de Zn e 33,2% de Ni. Dois agentes ambientalmente compatíveis, ou seja, um raminolípídeo (0,5%), com CMC de 0,005% (0,05g/L) e a CMCD (carboximetilciclodextrina) (5,3%) foram testados para a remoção de metais adsorvidos em dois tipos de solo. Após dez lavagens consecutivas, o raminolípídeo foi capaz de remover 14,2 e 15,3% do Pb contido nos solos testados, enquanto que a CMCD removeu 5 e 13,4% do metal contido nos solos testados (Neilson *et al.*, 2002).

3.5. Remoção do óleo lubrificante de motor

Após a percolação do biossurfactante no corpo de prova S-OL-B, a solução percolada foi analisada para determinação do conteúdo do óleo removido. Observou-se que o biossurfactante bruto foi capaz de remover 20% do óleo lubrificante adsorvido ao solo. Este resultado reflete as propriedades anfipáticas dos biossurfactantes, as quais permitem que esses compostos possam ser usados na remoção concomitante de diferentes tipos de poluentes ambientais como os metais pesados e os hidrocarbonetos presentes em resíduos e derramamentos de petróleo e derivados, entre outros, como descrito por Mulligan *et al.* (2001).

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o Rufisan pode ser aplicado em associação a barreiras de contenção da contaminação por resíduos sólidos urbanos na redução da permeabilidade do solo e na recuperação conjunta de contaminantes como metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo. A compatibilidade ambiental, bem

como a possibilidade de associação a métodos convencionais de remediação impulsiona o desenvolvimento dessa tecnologia alternativa.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

5. REFERÊNCIAS

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 10.005: Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos , Rio de Janeiro, 2004.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7182: Solos: ensaio de compactação. Rio de Janeiro, 1986.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6459: Solos: determinação do limite de liquidez. Rio de Janeiro, 1984b.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6508: Massa Específica dos grãos dos solos. Rio de Janeiro, 1984d.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 7180: Solos: determinação do limite de plasticidade. Rio de Janeiro, 1984c.

APHA - American Public Health Association. Standard methods for examination of water and wastewater. 19th ed. Washington: EPS Group, 1995. 1.268 p.

Asçi, Y., Nurbas, M., Açıkel, Y.S., 2008. A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. Journal of Hazardous Materials 154, 663-673.

Asçi, Y., Nurbas, M., Açikel, Y.S., 2007. Sorption of Cd (II) onto kaolin as soil component and desorption of Cd (II) from kaolin using raminolipídeo biosurfactant. Journal of Hazardous Materials 50-56.

Burden, D.S., Sims, J.L., 1998. Fundamentals of soil science as applicable to management of hazardous wastes. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, 24 p.

Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G.A., Uad, I., González-López, J., 2009. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Science of the Total Environment 407, 3634-3640.

Caputo, H.P. Mecânica dos solos e suas aplicações. LTC Livros técnicos e científicos. Editora S.A. v.1, Rio de Janeiro, 234p.1988.

Carvalho, J.C. (2004) Propriedades de comportamento de solos tropicais não saturados. In: Simpósio Brasileiro de Solos não Saturados, São Carlos. São Paulo. EESC-USP, v. 2, p 1-22.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo.** São Paulo : CETESB, 2001. 73 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA (1997). Manual de métodos de análise de solo. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisas de Solos. 212p.

Gomes, L.P. Geração, características e processos relacionados ao chorume gerado pela degradação de resíduos sólidos urbanos. Revista do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da UNISNOS. São Leopoldo, 2000. p. 31 – 41.

Hong, K.J., Tokunaga, S., Kajiuchi, T., 2002. Evaluation of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. *Chemosphere* 49, 379-387.

Mariano, M.O.A. Avaliação da retenção de gases em camadas de cobertura de aterros de resíduos sólidos. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Civil, CTG, Universidade Federal de Pernambuco, 225p., 2008.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology* 60, 371–380.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 1999. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science and Technology* 33, 3812–3820.

Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P., 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science* 94, 736-747.

Neilson, J.W., Artiola, J.F., Maier, R.M., 2002. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. *Journal of Environmental Quality* 32, 899–908.

Nobre, M.M.M. et al. Estudos para execução de uma barreira reativa objetivando o controle da migração de uma pluma de mercúrio. 5o Congresso Brasileiro de Geotecnia Ambiental (REGEO2003). Porto Alegre. 2003.

Peng, J.-F., Song, Y.-H., Yuan, P., Cui, X.-Y., Qiu, G.-L., 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. *Journal of Hazardous Materials* 161, 633-640.
Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2008. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 729-734.

Sparks, D.L. Environmental soil chemistry. San Diego, California: Academic Press, 1995. 267p.

Starr, R.C., Cherry, J.A., 1994. In situ remediation of contaminated ground water. The funnel-and-gate system. Ground water 465-476.

Suthersan, Suthan, S., Remediation engineering: design concepts. Boca Raton: Lewis publishers, 1996. 362 p.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos corpos de prova e dos percolantes

Tabela 2. Granulometria, consistência e classificação unificada do solo

Tabela 3 - Caracterização química do solo

Tabela 4 - Condutividade hidráulica do solo saturado pelos percolantes

Tabela 5 - Resultados dos ensaios de avaliação dos metais no solo antes e depois da percolação dos fluidos utilizando FAAS

TABELA 1

Denominação do corpo de prova	Descrição do tipo de percolante(s)
SN	Solo sem percolação (solo normal)
S-AD	Solo percolado por água destilada
S-CH	Solo percolado por chorume
S-OL-B	Solo resultante da mistura solo e óleo lubrificante usado, percolado por biossurfactante
S-CH-B	Solo percolado por chorume e, em seguida, por biossurfactante

TABELA 2

Granulometria (%)	
Areia	41
Silte	17
Argila	42
% LP < 2 μ m	24
Consistência	
Limite de liquidez (LL) (%)	38
Índice de plasticidade (IP)	14
(%)	
Ia ^a	0,48
Compactação	
Umidade ótima (%)	19,0
μ_{dmax}^b (kN/m ³)	16,9
Classificação	CL
Unificada	

^aIa = IP/< 2 μ m - Atividade, ^b μ_{dmax} : peso específico aparente seco máximo

TABELA 3

Determinação	SN
pH em água	5,20
pH em KCl	4,04
Matéria Orgânica	0,00
Alumínio Extraível (Al ⁺⁺⁺)	0,35
Ca ⁺⁺ trocável	0,00
Mg ⁺⁺ trocável	5,80
Na ⁺ trocável	7,60
K ⁺ trocável	0,50
% saturação de Sódio	54,50
Valor de S (soma de cátions)	13,94
Hidrogênio extraível (H ⁺)	5,85
Valor de T (Cap. Troca Cátions)	20,14
Valor de V (% Sat. de Base)	69,21
% Fe ₂ O ₃ no Ext. Sulfurico	4,63
% SiO ₂ na terra fina	73,0
% Al ₂ O ₃ no Ext. Sulfurico	13,0
% água no extrato saturação	44,2
Cond. Elétrica no ext. sat. (µS/m)	0,012
Superfície específica	14,7

TABELA 4

Valores	Solo - Fluido percolante (corpo de prova)				
	S-AD ^b	S-CH ^b	S-CH-B ^b	S-OL	S-OL-B ^b
Condutividade hidráulica k (m/s)	3,61x10 ⁻⁹	5,91x10 ⁻⁹	1,0 x 10 ⁻¹⁰	1,93 x 10 ⁻⁷	1,43x10 ⁻⁹
Relação K _{ip} /K _{ad} ^a	1	1,60	0,68 a	53,46	0,39

^a K_{ip}: Condutividade hidráulica com o fluido percolante; K_{ad}: Condutividade hidráulica com a água destilada; ^bS-AD: solo-água destilada; S-CH: solo-chorume; S-CH-B: solo-chorume- biossurfactante; S-OL: solo-óleo; S-OL-B: solo-óleo-biossurfactante

TABELA 5

Metais	Quantificação						
	Solo	S-OL-B^b (g/kg)		S-CH^b (g/kg)		S-CH-B^b (g/kg)	
Pesados	(g/kg)	Entrada	Saída	Entrada	Saída	Entrada	Saída
Fe	52,500	51,705	43,850	48,075	48,080	44,500	50,985
Cd	0,0009	0,0012	0,0006	0,0010	0,0010	0,0005	0,0007
Zn	0,0191	0,0147	0,1485	0,0144	0,0144	0,3616	0,0137
Cu	0,0133	0,0128	0,0154	0,0076	0,0041	0,1615	0,0051
Pb	0,014	0,012	0,014	0,015	0,013	0,013	0,017

^a unidade para o óleo; ^bS-AD: S-CH: solo-chorume; S-CH-B: solo-chorume-biossurfactante; S-OL-B: solo-óleo-biossurfactante