

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO
BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*
DE AMBIENTE ANTÁRTICO**

HUGO ALMEIDA CAMARGO

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia-Minas Gerais

Setembro de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DO
BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *RHODOTORULA MUCILAGINOSA*
DE AMBIENTE ANTÁRTICO**

HUGO ALMEIDA CAMARGO

EDGAR SILVEIRA CAMPOS

THAMIRYS GIMENES COUTINHO DE SOUSA

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia-Minas Gerais

Setembro de 2019

RESUMO

A produção de biosurfactantes advém de microrganismos que são biodegradáveis, biocompatíveis e que possuem baixa toxicidade. Também observa-se que são estáveis em condições extremas como a variação do pH, temperatura e salinidade. O ambiente antártico apresenta uma imensa diversidade de microrganismos bem adaptados. A utilização deles como uma fonte de bioprodutos estáveis na tecnologia está abrindo um novo mercado que visa isolá-los e pesquisar em que podem ser úteis. A importância para a ampliação de bioprodutos consiste na redução dos custos de produção e na melhoria do aproveitamento da biomassa, com destaque para os resíduos de abacaxi (*Ananas comosus*). Este trabalho relata a avaliação da produção de biosurfactante pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* isolada da Antártica codificada como L69. Para o cultivo da levedura, utilizou-se o meio YPD para pré inóculo, o qual foi incubado por 72 horas a 15°C e 120 rpm. Para o inóculo utilizou-se o meio YPD modificado com os melhores componentes analisados para fonte de carbono e nitrogênio (extrato de abacaxi, extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio) incubado por 24 horas a 15°C e 120 rpm. Foi estudado 6 diferentes metodologias para extração do biosurfactante e a metodologia utilizando acetona fria se destacou com um rendimento de 27g.L⁻¹ e 4,01 para desvio padrão. Para caracterização da biomolécula, utilizou-se os testes de emulsificação E24, com resultado de 64,5% permanecendo estável durante os 30 dias de análises na concentração da CMC e o teste de tensão superficial trazendo como resultado uma CMC de 59,14g.L⁻¹. Como aplicação foi feito a lavagem de solo contaminado com óleo de motor e para este experimento obteve-se o resultado de 50% de remoção. Após as avaliações conclui-se que o este biosurfactante pode possuir uma alta massa molecular, além de poder atuar na biorremediação como um coadjuvante.

PALAVRAS CHAVES: Fermentação submersa; Levedura; Abacaxi; Biosurfactante; Antártica.

ABSTRACT

The production of biosurfactants, comes from microorganisms that are biodegradable, biocompatible and have low toxicity. It was also observed that are stable under extreme conditions such as varying pH, temperature and salinity. The Antarctic

environment has a huge diversity of well-adapted microorganisms. Their use as a source of stable bioproducts technology is opening up a new market that aims to isolate them and search that can be useful. The importance for the expansion of bioproducts is to reduce production costs and improving the utilization of biomass, especially the pineapple waste (*Ananas comosus*). This paper reports the evaluation of biosurfactant production by *Rhodotorula mucilaginosa* yeast isolated encoded Antarctica as L69. For yeast cultivation, YPD medium was used for pre inoculum, which was incubated for 72 hours at 15°C and 120 rpm. For the inoculum, the modified YPD medium with the best components analyzed for carbon and nitrogen source (pineapple extract, yeast extract, peptone and ammonium sulfate) were incubated for 24 hours at 15°C and 120 rpm was used. Six different biosurfactant extraction methodologies were studied and the methodology using cold acetone stood out with a yield of 27g.L⁻¹ and 4.01 for standard deviation. For characterization of the biomolecule, the emulsification tests E24 were used, with 64.5% results remaining stable during the 30 days of analysis in the concentration of CMC and the surface tension test resulting in a CMC of 59.14g.L⁻¹. As application was made the washing of soil contaminated with motor oil and for this experiment the result of 50% removal was obtained. After the evaluations it is concluded that this biosurfactant can have a high molecular mass, besides being able to act in the bioremediation as an adjuvant.

KEYWORDS: Submerged fermentation; Yeast; Ananas; Biosurfactant; Antartic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
3.1. Obtenção do microrganismo.....	4
3.2. Meio de cultura e adaptação dos microrganismos – Pré inóculo	4
3.3. Influência da fonte de carbono e de nitrogênio na produção do biossurfactante .	4
3.4. Meio Fermentado.....	5
3.5. Metodologias de extração.....	5
3.5.2. Metodologia 2:.....	5
3.5.3. Metodologia 3:.....	6
3.5.4. Metodologia 4:.....	6
3.5.5. Metodologia 5:.....	6
3.5.6. Metodologia 6:.....	6
3.6. Caracterização do biossurfactante	6
3.6.1. Índice de Emulsificação (E24)	6
3.6.2. Tensão Superficial	7
3.6.3. Concentração micelar crítica (CMC).....	7
3.6.4. Estabilidade	7
3.7. Resíduos Agroindustriais.....	8
3.8. Biorremediação – Lavagem de solos contaminados com biossurfactante	8
3.9. Metodologia para os ensaios.....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
4.1. Influência da fonte de Carbono e de Nitrogênio na produção do biossurfactante..	9
4.2. Metodologia de extração	10
4.3. Caracterização do biossurfactante	11
4.3.1. Concentração Micelar Crítica (CMC) e tensão superficial	11
4.3.2. Estabilidade da emulsão	13
4.3.3. Estabilidade frente a temperatura, pH e salinidade	14
4.4. Biorremediação - Lavagem de solos contaminados com biossurfactante	18
5. CONCLUSÃO.....	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

1. INTRODUÇÃO

No passado, os surfactantes advindos de processos petroquímicos e oleoquímicos eram os mais abundantes no mercado. Contudo a necessidade de encontrar opções menos tóxicas ao meio ambiente e mais biodegradáveis propiciou um aumento nas pesquisas com recursos renováveis. Os biossurfactantes receberam uma notável atenção, sendo considerados substitutos apropriados para os surfactantes químicos (KOGLIN *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2011).

Os biossurfactantes consistem em um grupo de biomoléculas produzidas por microrganismos, dentre eles, fungos, leveduras e bactérias. Por serem caracterizados como moléculas anfipáticas (parte polar e parte apolar) interagem com soluções aquosas e misturas de hidrocarbonetos e, assim são capazes de diminuir a tensão de superfície e a concentração micelar crítica (CMC) promovendo micro emulsificações no meio e espuma. (COOPER, 1986; ROSEMBERG, 1986; HAERBURG *et al.* 1986; FIECHTER, 1992; GEORGIU *et al.*, 1992; KOSARIC, 1993).

Devidos as suas propriedades únicas, os biossurfactantes apresentam diversas aplicações no setor industrial, como em processos de biorremediação, que consiste na utilização do metabolismo de microrganismos para diminuir ou eliminar determinados poluentes em locais de extrema dificuldade, tornando os poluentes biodisponíveis a sua biodegradação. Na agricultura agindo no controle biológico. Na indústria de alimentos como substituto aos emulsificantes sintéticos em maioneses, molhos, sorvetes (BANAT *et al.*, 2000). E também na área de cosméticos pois suas características umectantes o deixa mais compatível com a pele o que gera um menor grau de irritação (MAIER e SOBERÓN –CHAVEZ, 2000).

Estudos realizados anteriormente já demonstraram que os biossurfactantes apresentam características antimicrobianas e, por possuírem elevada capacidade antibacteriana, antifúngica e antiviral as áreas farmacêutica e médica já visam sua utilização comercial. Um dos assuntos em destaque refere-se a alguns biossurfactantes que poderão ser utilizados para impedir a fixação de agentes patogênicos e futuramente atuar como agente terapêutico e probiótico (SINGH e CAMEOTRA, 2004).

É importante ressaltar que os meios para obtenção dos biossurfactantes apresentam inúmeras possibilidades de formulação, sendo elas influenciadas principalmente pelas fontes de carbono e de nitrogênio. Contudo a presença de fósforo, ferro, manganês, magnésio podem otimizar a produção, assim também como o controle do pH, temperatura, atmosfera, salinidade, agitação e condução de todo o processo. (BANAT, 1995). Os componentes já citados devem ser analisados para cada microrganismo, visto que muitos ainda são desconhecidos e podem apresentar características totalmente diferentes.

Com a existência de diversas aplicações dos biossurfactantes, pesquisadores estão impulsionando projetos à procura de novos microrganismos em lugares antes não almejados. A Antártica, um dos principais cenários com ambientes que favorecem o desenvolvimento de microrganismos com capacidade de se adaptar a ambientes extremos, tornou-se alvo de estudo, não apenas na busca por microrganismos produtores de biomoléculas de interesse, como também com o intuito de compreender a flora, fauna e microbiota deste ambiente tão pouco explorado (PAVLOVA *et al.*, 2011).

Afim de reduzir os custos na produção dos biossurfactantes a utilização de resíduos agroindustriais no meio resultará na economia visível, considerando que a composição do meio de cultivo equivale a 30% dos custos totais para produção dos biossurfactantes (BANNAT *et. al.*, 2014). Em consideração a isso, o presente estudo justifica-se pela busca do melhoramento da qualidade e aumento da produção de modo exponencial dos surfactantes biológicos, através do estudo com levedura *Rhodotorula mucilaginosa* proveniente da Antártica e uso de resíduo agroindustrial (abacaxi) para composição do meio de cultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Produzir, purificar, caracterizar e aplicar o biossurfactante produzido por *Rhodotorula mucilaginosa* de ambiente Antártico.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para produção do biossurfactante por cultivo submerso;
- 2.2.2. Investigar diferentes métodos de extração da biomolécula;
- 2.2.3. Caracterizar o surfactante microbiano por técnicas físico-químicas;
- 2.2.4. Analisar capacidade de remoção de óleo de solo contaminado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção do microrganismo

A levedura da Antártica *Rhodotorula mucilaginosa*, codificada por L 69, é proveniente da coleção de culturas da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/Unicamp).

Deu-se a preservação do microrganismo em criotubos contendo glicerol a 50% (v/v). Por ocorrer a inoculação a partir da mesma cultura inicial, possibilitou-se a utilização da mesma geração de células ao longo de todo o estudo.

3.2. Meio de cultura e adaptação dos microrganismos – Pré inóculo

Uma miçanga de vidro foi inoculada em um Erlenmeyer contendo 20 mL de meio YPD (extrato de levedura $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; e peptona $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e glicose $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), o qual foi incubado a 15°C por 72 horas a 120 rpm, tempo necessário para que a cultura alcance o fim de sua fase de crescimento e o início da fase estacionária. Uma amostra que possua uma unidade de densidade ótica foi utilizada para inocular as próximas culturas.

3.3. Influência da fonte de carbono e de nitrogênio na produção do biossurfactante

Em Erlenmeyers de 250 ml contendo 150 ml meio YPD modificados para seleção de fonte de carbono e nitrogênio. Uma densidade ótica (DO), a 600 nm, do pré inóculo, descrito no item 3.2. foi usada para inoculação do microrganismo. Utilizou-se como seleção para fonte de carbono: acetato de sódio, citrato de sódio, glicose, sacarose, peptona, extrato de levedura, extrato de abacaxi e extrato de caju, em quantidade suficiente para atingir a quantidade de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, a qual é a mesma de açúcares redutores do meio YPD. Já para a fonte de nitrogênio substituíram-se o extrato de levedura e peptona pelos compostos: citrato de amônio, nitrato de amônio, sulfato de amônio, peptona e extrato de levedura, na concentração de $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Por fim, para a produção dos

meios foi necessário a utilização de uma solução salina com concentração de 10g.L^{-1} , 5g.L^{-1} , 2g.L^{-1} e $0,2\text{g.L}^{-1}$ de NaCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, respectivamente. Após foi incubado nas condições de 15°C por 24 horas a 12- rpm.

3.4.Meio Fermentado

Para o meio de fermentação, uma densidade óptica (DO), a 600 nm, do pré inóculo, descrito no item 3.2. foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL do meio composto por: extrato de abacaxi (25 g.L^{-1}), extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona ($1,5\text{ g.L}^{-1}$), sulfato de amônio (1 g.L^{-1}) em uma solução salina com concentração: 10g.L^{-1} , 5g.L^{-1} , 2g.L^{-1} e $0,2\text{g.L}^{-1}$ de NaCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. E incubado por 24 horas a 15°C com agitação a 120 rpm.

3.5.Metodologias de extração

Foram testadas seis metodologias gravimétricas distintas para a extração do biosurfactante, dentre elas foi selecionada a que apresentou maior rendimento e repetibilidade. Para acidificação foi utilizado HCl 6M. O material foi centrifugado o meio fermentado durante 20 minutos a 8.000 G, para possibilitar a remoção das células, após realizou-se as seguintes metodologias:

3.5.1. Metodologia 1:

Após a acidificação para pH 2, a amostra foi incubada por quatro horas à 4°C . Após, adicionou-se uma solução de acetato de etila/metanol (4:1 (v/v)). Agitou-se a mistura em 120 rpm por 10 minutos. Com a utilização de um funil de separação, recuperou-se a fase orgânica, a qual passou pelo rotoevaporador a 80°C . O resíduo resultante foi suspenso em acetona e seco em placas de petri para pesagem posterior.

3.5.2. Metodologia 2:

Após a acidificação para pH 2, a amostra foi incubada a 4°C no período overnight. Em seguida adicionou-se acetato de etila (v/v) e agitou a mistura a 120 rpm por 10 minutos. Com o funil de separação recuperou-se a fase orgânica, a qual passou pelo

rotoevaporador a 80°C, o resíduo resultante foi seco em placas de petri para pesagem posterior.

3.5.3. Metodologia 3:

Foi adicionado 2 mL de acetato de etila em 2 mL de amostra, após submeteu-se a mistura a uma agitação em vórtex por 2 minutos. Retirou-se assim um mL da fase superior da mistura que foi seca em placas de petri para pesagem posterior.

3.5.4. Metodologia 4:

Após a acidificação para pH 2, adicionou-se uma solução de clorofórmio/metanol (2:1 (v/v)) à amostra e manteve-a em agitação a 120 rpm por 15 minutos. Com a utilização de um funil de separação foi recuperada a fase orgânica que por sua vez passou pelo rotoevaporador a 60°C. O resíduo final foi seco em placas de petri para pesagem posterior.

3.5.5. Metodologia 5:

Foi adicionado acetato de etila (v/v) a amostra e com um funil de separação recuperou-se a fase orgânica a qual passou pelo rotoevaporador a 80°C. O resíduo gerado foi suspenso em hexano e submetido a rotoevaporação a 70°C. Após a terceira repetição do processo, o resíduo final foi seco em placas de petri para pesagem posterior.

3.5.6. Metodologia 6:

Foi adicionado 3 mL de acetona a 4°C à amostra, após incubou-se a mistura por 10 horas a 4°C. O precipitado da mistura foi ressuspenso em água deionizada e seco em placas de petri para pesagem posterior.

3.6. Caracterização do biossurfactante

Após os tempos de fermentação e extração do biossurfactante foi feita sua caracterização a partir dos testes de emulsificação, estabilidade da emulsão, tensão superficial, concentração micelar crítica e estabilidade em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

3.6.1. Índice de Emulsificação (E24)

Através da metodologia descrita por Cai *et al.* (2014) determinou-se o índice de emulsificação, que se baseia na mistura do óleo mineral com a solução aquosa livre de células do caldo fermentativo, na proporção de 1:1. Com o auxílio de um vortex, a mistura foi fortemente agitada durante 2 minutos e após 24 horas de repouso, a amostra foi analisada. A taxa de emulsificação deu-se pela razão entre a altura da parte emulsificada e a altura total, e após convertida em porcentagem.

Para estabilidade da emulsão foi observado durante 30 dias as análises do E24, diariamente, nos cinco primeiros dias, e de cinco em cinco dias, até o final do ciclo.

3.6.2. Tensão Superficial

Através do método do anel de du Noüy (1925), determinou-se a tensão superficial, a qual foi necessário a utilização do tensiômetro modelo K6 (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemanha) para medir a tensão superficial de 5 mL de amostra da solução aquosa livre de células do caldo fermentativo à temperatura ambiente. Para calibração foi realizada a tensão do álcool etílico, realizando posteriormente a divisão do valor padrão pelo valor real, razão multiplicada com o valor da tensão obtida da amostra.

3.6.3. Concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) foi medida pela determinação da tensão superficial para uma série de diferentes diluições do biossurfactantes em água destilada. Foram preparadas soluções aquosas de biossurfactantes com diferentes concentrações e a concentração micelar crítica (CMC) foi avaliada como sendo o ponto central de inflexão da curva da tensão superficial expressa em função da concentração de biossurfactante (DESAI; BANAT, 1997).

3.6.4. Estabilidade

Para a verificação da estabilidade do biossurfactante produzido a amostra foi submetida a diferentes estresses no período de 10 minutos antes das avaliações de E24 e tensão superficial. Tais estresses caracterizam-se pela alteração da temperatura, salinidade e pH (DUBEY, et al., 2012). Para o teste de estabilidade térmica foi variado a temperatura (°C) em -70, -4, 10, 20, 40, 60, 80 e 100, em banho no termociclador. Para a estabilidade em relação ao pH foi utilizado diferentes tampões a fim de manter o pH

inalterado durante as análises em 2; 4,2; 6,2; 8,2 e 10. Já a estabilidade salina foi utilizada soluções de cloreto de sódio (NaCl) nas concentrações (g.L⁻¹) de 5, 10, 15, 20, 25 e 100.

3.7. Resíduos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais de abacaxi (*Ananas comosus*) e de caju (*Anacardium occidentale*), foram adquiridos nos mercados locais, onde o abacaxi *in natura* e o caju *in natura* foram lavados com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% (v/v) e processados no laboratório. Para o abacaxi, os resíduos constaram de casca e folhas do abacaxizeiro e foram processados em moinho. Já os resíduos agroindustriais de caju constaram do pedúnculo do fruto do cajueiro.

3.8. Biorremediação – Lavagem de solos contaminados com biossurfactante

A metodologia utilizada para avaliação da capacidade que os biossurfactes possuem de remoção de hidrocarbonetos em solos contaminados foi a de França *et al.* (2015). Foram inseridas 2 g de óleo cru ou óleo de motor em amostras de 20 g de solo, em seguida transferidos a erlenmeyers de 250 mL. Aproximadamente 40 mL de solução de biossurfactante 250 mg.L⁻¹ foram adicionados aos erlenmeyers contendo o solo contaminado. Os erlenmeyers foram incubados em agitador orbital a 120 rpm e 27°C por 24 horas. Após este período, adicionou-se hexano nas amostras para a extração do óleo, em sequência foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos para que haja a remoção do solo. O óleo cru ou óleo de motor foi quantificado gravimetricamente.

3.9. Metodologia para os ensaios.

Todos os testes deste estudo contaram com a repetição em triplicatas, utilizando suas respectivas médias para análises de resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da fonte de Carbono e de Nitrogênio na produção do bissurfactante

A figura 1 representa os resultados para o índice de emulsificação e de tensão superficial com o intuito de selecionar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a levedura L69.

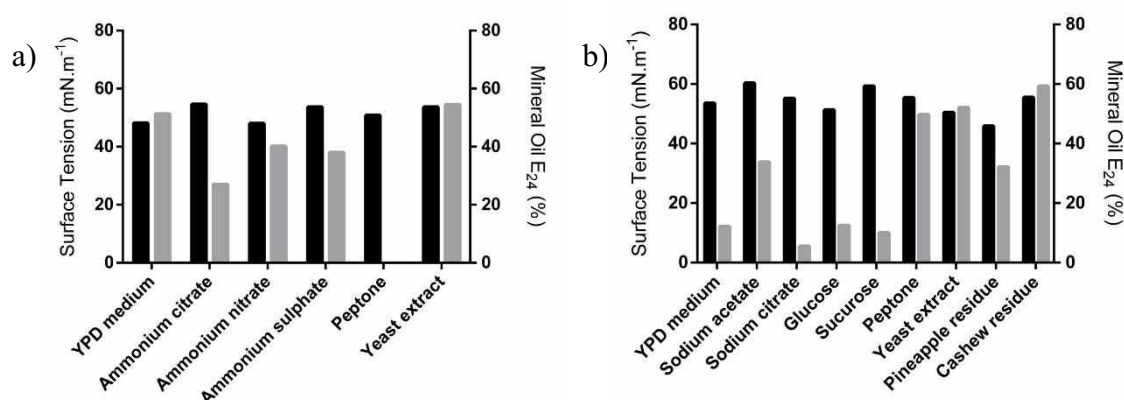


Figura 1 – Tensão superficial (mN.M^{-1}) e índice de emulsificação em óleo mineral (%), da levedura L 69 a. Diferentes fontes de nitrogênio; b. Diferentes fontes de carbono. Legenda: Colunas pretas representam os resultados da tensão superficial e as colunas cinzas representam os dados do índice de emulsificação

Conforme apresentado na figura 1a foi analisado que os melhores resultados para o índice de emulsificação foram os que tiveram extrato de levedura e o nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Já para a tensão superficial destacaram o nitrato de amônia e peptona.

A figura 1b demonstra os resultados para a seleção da fonte de carbono que se destacaram para o índice de emulsificação os compostos de extrato de levedura e resíduos de caju e para tensão superficial o melhor resultado obtido foram os resíduos de abacaxi e o extrato de levedura.

A tensão superficial está ligada inversamente proporcional a produção de biossurfactante, enquanto o índice de emulsificação diretamente proporcional. Ambos geram dados que confirmam ou não a produção do biossurfactante. O índice de emulsificação consiste em um teste utilizado para confirmar a produção do biotensioativo no meio estudado, uma vez que já é conhecido que estas biomoléculas são capazes de modificar a hidrofobicidade da superfície celular além de promover a emulsão ou

solubilização de soluções de óleo que antes seriam imiscíveis além disso tais biomoléculas são caracterizadas pela redução da tensão superficial. (Beal & Betts, 2000). Contudo há a possibilidade dessa biomolécula não ser produzida, e apresente as demais propriedades, como a capacidade de formar emulsão. (YOUSSEF *et al.*, 2004).

Com os resultados obtidos, analisamos que as melhores fontes de carbono e nitrogênio que se enquadram em nosso estudo são: resíduos de abacaxi, resíduos de caju, peptona, extrato de levedura e nitrato de amônia.

4.2. Metodologia de extração

Como descritos no item 3.5, para a extração do biossurfactante, foram testadas seis diferentes metodologias gravimétricas com intuito de seleção da mais eficiente e com maior repetibilidade. A figura abaixo apresenta os resultados obtidos.

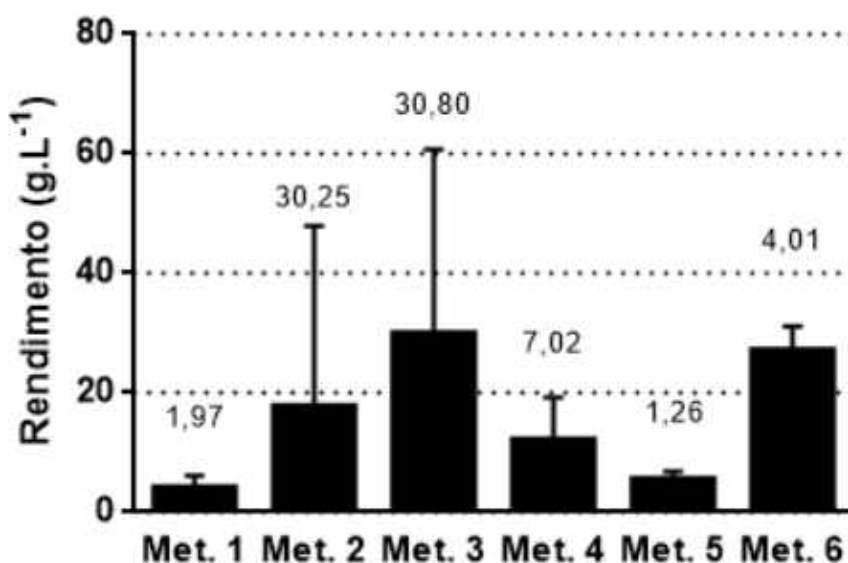


Figura2: Rendimento g.L⁻¹ das metodologias testadas para extrato do biossurfactante proveniente da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L69.

Com a análise da figura pode-se perceber que os resultados apresentados pelas metodologias dois e três alcançaram uma elevada produtividade, de 18 e 30 g.L⁻¹ respectivamente, contudo obtiveram um desvio padrão (SD) de aproximadamente 30, caracterizando a não repetibilidade. Para as metodologias um e cinco obtiveram-se os menores índices de desvio padrão, mas também trouxeram um baixo rendimento, na

primeira 1,97 com 4g.L^{-1} e na segunda 1,26 com $5,5\text{g.L}^{-1}$. A metodologia 4 indicou um desvio padrão de 7,02 com o rendimento de $13,69\text{g.L}^{-1}$, enquanto que, a metodologia 6 apresentou 4,01 para o desvio padrão e 27g.L^{-1} para o rendimento. Com a percepção de que é necessário ter um alto rendimento em conjunto com um baixo desvio padrão foi selecionado a metodologia 6, acetona fria, para as próximas etapas do presente trabalho.

Investigando na literatura, encontra-se o uso deste método de extração com acetona fria, como no estudo de Khadydja e colaboradores (2016) onde o biossurfactante produzido pela levedura *Candida lipolytica* em biorreator com meio de baixo custo composto de 5% de gordura animal e 2,5% de licor de maceração de milho, que obteve um rendimento totalizado em 10g.L^{-1} após 96 horas de fermentação. Em outro estudo, Daverey e Pakshirajan (2010), em um fermentador com controle de pH e outras condições de operação, estudaram a produção de um soforolípido produzido por *S.bombicola* e como extração optaram pela utilização do acetato de etila e isopropanol (4:1) para extração após uma lavagem posterior com hexano, o qual obtiveram um rendimento de 33g.L^{-1} . Tendo em vista que os resultados obtidos por esses autores foram abaixo e similar, respectivamente, ao apresentado neste trabalho, confirmou-se que a extração do biossurfactante, produzido pela levedura L69, se faz melhor pela metodologia com acetona fria, que provoca a precipitação da biomolécula de interesse.

4.3. Caracterização do biossurfactante

4.3.1. Concentração Micelar Crítica (CMC) e tensão superficial

Como descrito no item 3.6.4 foi determinada a concentração micelar crítica (CMC) que atingiu $59,14\text{g.L}^{-1}$. Já a análise de tensão superficial que está descrita no item 3.6.3, foi realizada utilizando o extrato bruto e o mesmo com diluições de 1:10 e 1:100, tendo como resultados 47,57; 54,34; $60,83\text{ mN.m}^{-1}$, respectivamente, como apresentados nas figuras a seguir.

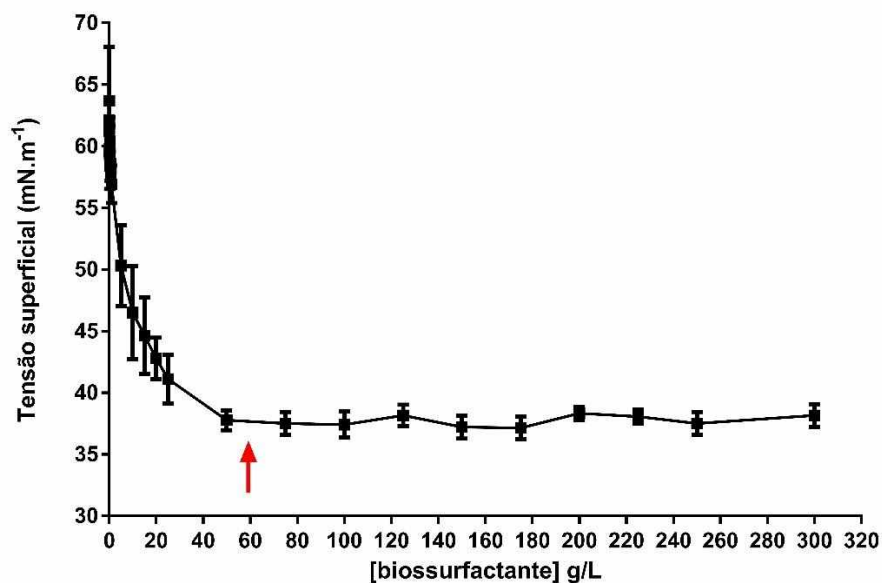


Figura 3: Concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante (BS) extraído

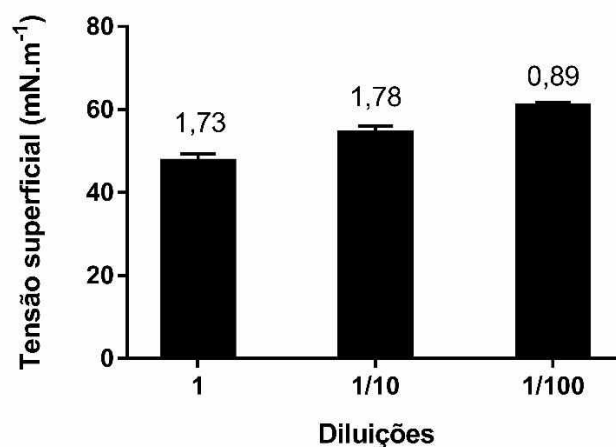


Figura 4: Tensão superficial do extrato bruto e diluições 1:10 e 1:100.

Silva e demais autores (2014) estudaram a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomona cepacia* e com isso determinou a menor CMC descrita na literatura, chegando a $0,156 \text{ mg.L}^{-1}$ com uma tensão superficial mínima de $29,77 \text{ mN.m}^{-1}$. Khopade *et. al.*, (2012) com a caracterização do biossurfactante produzido pela *Streptomyces* B3, apresentou o resultado de 110 mg/L para a CMC com uma redução da tensão superficial para 30 mN.m^{-1}

Segundo estudos realizados, a eficiência na redução da tensão superficial é mais eficaz quando utilizados surfactantes produzidos por bactérias. O foco da maioria dos

estudos concentra em pesquisas com *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentam valores para a redução superficial de aproximadamente 27 a 28 mN.m⁻¹ (LANG e WULLBRANDT, 1999; SANTA ANNA *et al.*, 2001; GAUTAM e TYAGI, 2006). Os biossurfactantes podem ser subdivididos em dois grupos, baixo e alto peso molecular, o primeiro é caracterizado por reduzir a tensão superficial e o segundo pelo auxílio na formação de emulsões (ROSENBERG & RON, 1997, 1999).

Comparando os resultados obtidos para a L69 infere-se que o valor atingido para a CMC foi elevado, necessitando de uma concentração de biossurfactante maior para que reduza a tensão superficial em um nível próximo ao analisado na literatura. Também analisa-se que o biossurfactante provavelmente possui um alto peso molecular, pois possui uma maior atividade de emulsão do que redução da tensão superficial.

4.3.2. Estabilidade da emulsão

A estabilidade da emulsão foi caracterizada de acordo com a metodologia apresentada no item 3.6.1 a qual foi testada para o extrato bruto, caldo fermentado livre de células, e para o biossurfactante extraído com acetona fria, sendo que para o último caso foi avaliado 3 diferentes concentrações. A primeira na CMC do biossurfactante (59,14g.L⁻¹), na segunda, no dobro da CMC (118,28g.L⁻¹) e na terceira, na metade da CMC (29,57g.L⁻¹). Os resultados estão apresentados na figura abaixo.

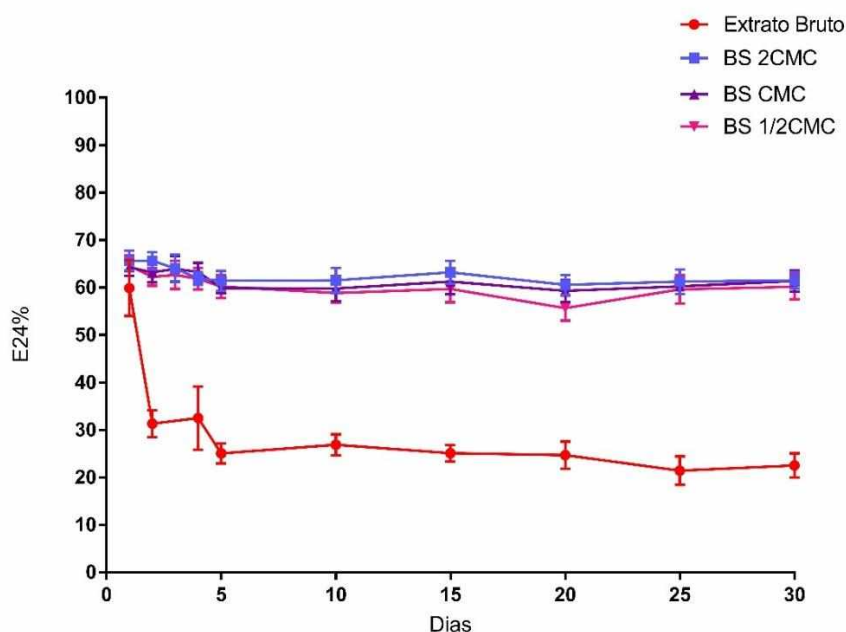


Figura 5: Estabilidade da emulsão: Extrato bruto x BS (2CMC, CMC e 1/2CMC)

Com a utilização do teste *t-student* a 95% de confiança, pode-se concluir que após o quarto dia o extrato bruto não apresentou uma variação significativa, estabilizando-se a uma E24 de 32,5%. Para BS na concentração de 1/2CMC permaneceu constante a partir do terceiro dia com uma E24 de 62,6%, na concentração CMC se manteve estável durante os trinta dias a um valor de 64,5% para E24, já para a última concentração analisada, de 2CMC, foi averiguado o resultado de 61,8% para E24 e se estabilizou após o quarto dia. Ao final das análises individuais foi comparado os resultados de E24 para distintas concentrações de BS e como demonstrado no gráfico acima é possível perceber que não houve uma diferença significativa entre os dados, ou seja, todos possuem uma capacidade semelhante de manter a emulsão estável, portanto é possível e válido utilizar a concentração de 1/2CMC a fim de economizar BS. O extrato bruto demonstrou o pior desempenho, deixando uma diferença em aproximadamente 30% com os demais.

4.3.3. Estabilidade frente a temperatura, pH e salinidade

Para o identificar a estabilidade do biossurfactante extraído variou-se a temperatura, o pH e a salinidade em -70 a 100°C, 2 a 10 e 5 a 100g.L⁻¹, respectivamente. As concentrações utilizadas foram 2CMC (118,28g.L⁻¹), CMC (59,14g.L⁻¹) e 1/2CMC (29,57g.L⁻¹). Foi mensurado a tensão superficial e o E24, comparando-se os resultados estaticamente com o teste *t-student*. Os resultados estão apresentados nas figuras a seguir.

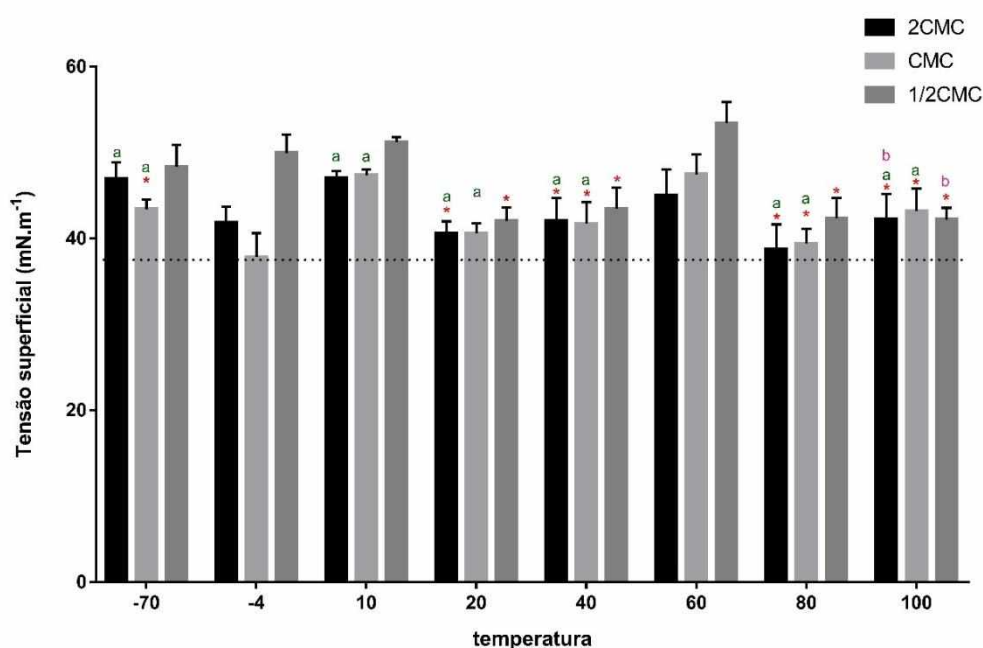


Figura 6: Tensão superficial em diferentes concentrações após aplicação de estresse em várias temperaturas. * $p < 0,05$ comparado com o controle; ^a $p < 0,05$ comparado com CMC; ^b $p < 0,05$ comparado com 2CMC.

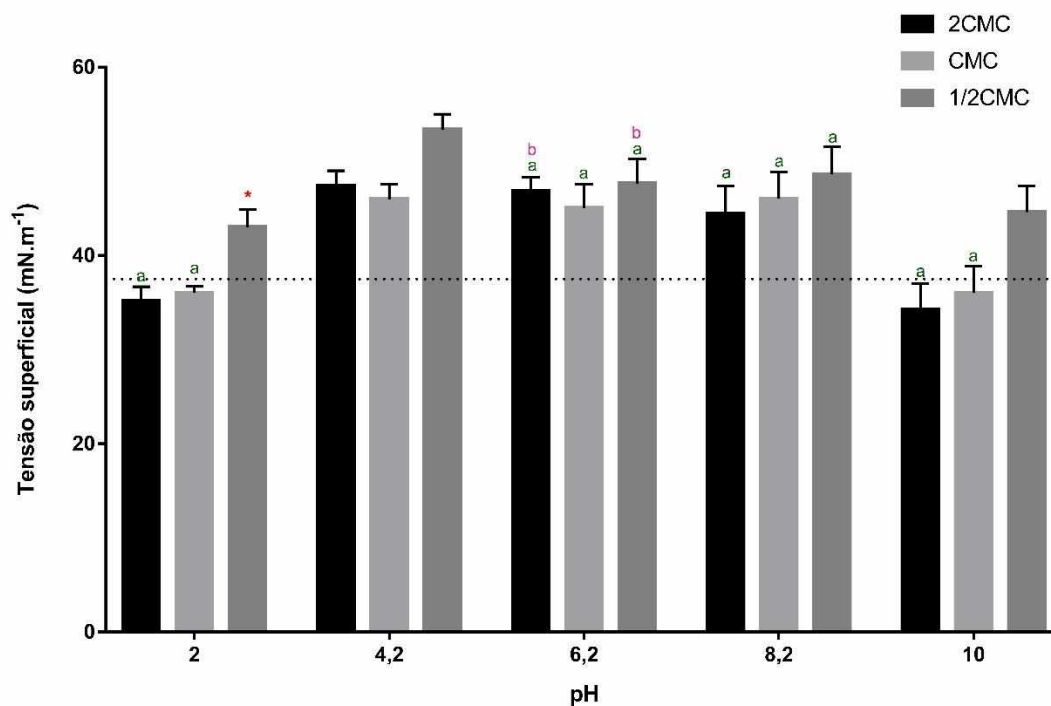


Figura 7: Tensão superficial em diferentes concentrações após aplicação de estresse em vários pH. * $p < 0,05$ comparado com o controle; ^a $p < 0,05$ comparado com CMC; ^b $p < 0,05$ comparado com 2CMC.

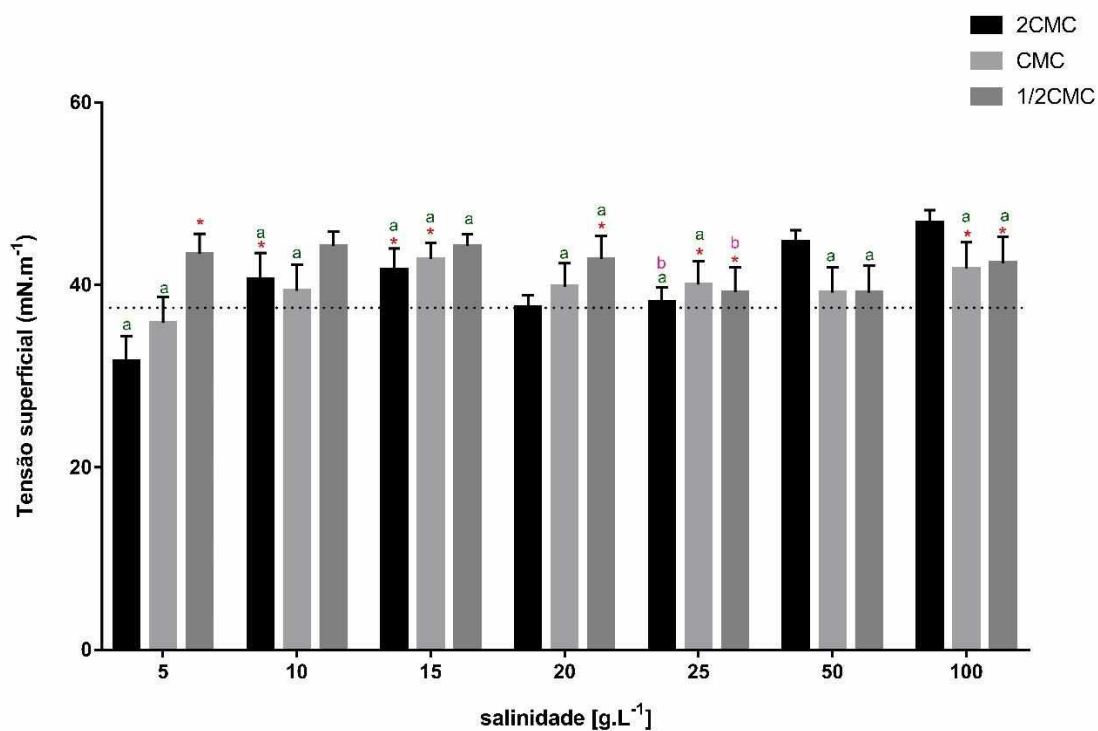


Figura 8: Tensão superficial em diferentes concentrações após aplicação de estresse em várias concentrações de NaCl. * $p < 0,05$ comparado com o controle; ^a $p < 0,05$ comparado com CMC; ^b $p < 0,05$ comparado com 2CMC.

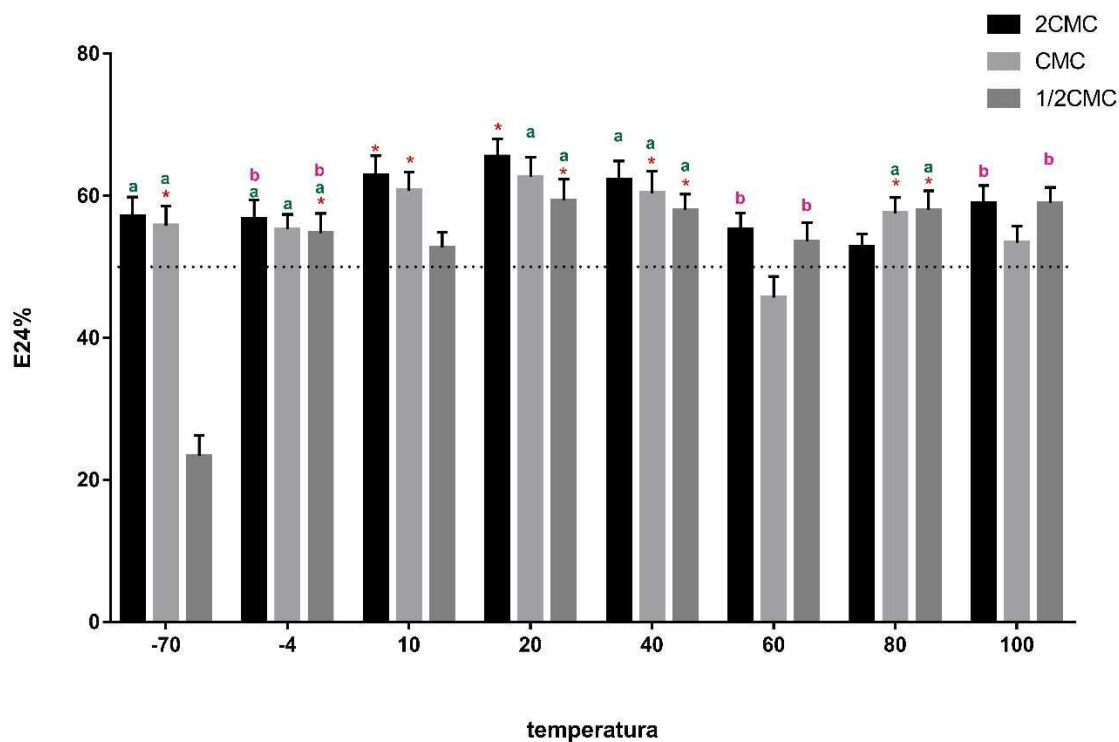


Figura 9: Índice de Emulsificação em diferentes concentrações após aplicação de estresse em várias temperaturas. * $p < 0,05$ comparado com o controle; ^a $p < 0,05$ comparado com CMC; ^b $p < 0,05$ comparado com 2CMC

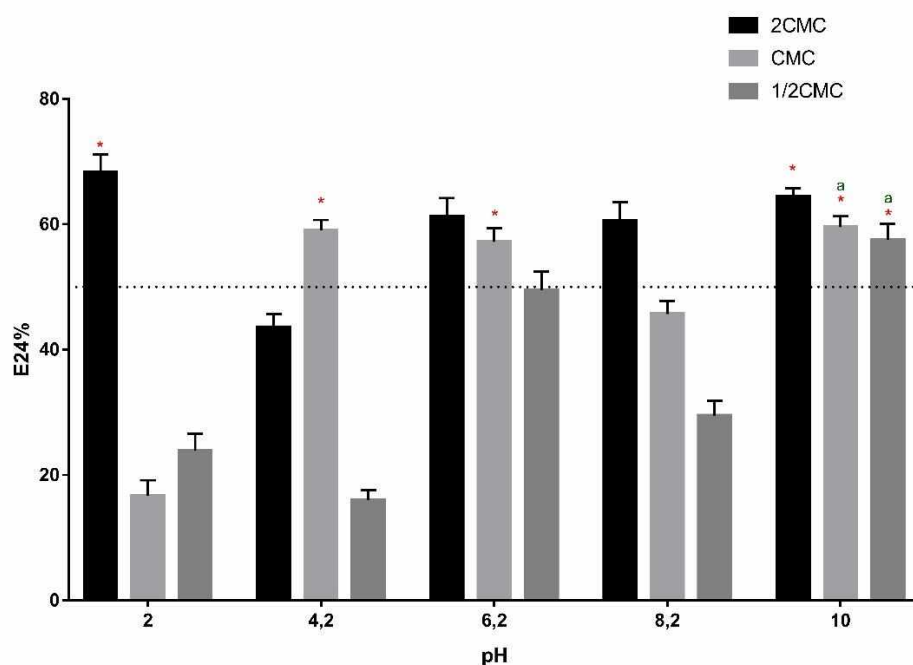


Figura 10: Índice de Emulsificação em diferentes concentrações após aplicação de estresse em vários pH. * $p < 0,05$ comparado com o controle; ^a $p < 0,05$ comparado com CMC; ^b $p < 0,05$ comparado com 2CMC

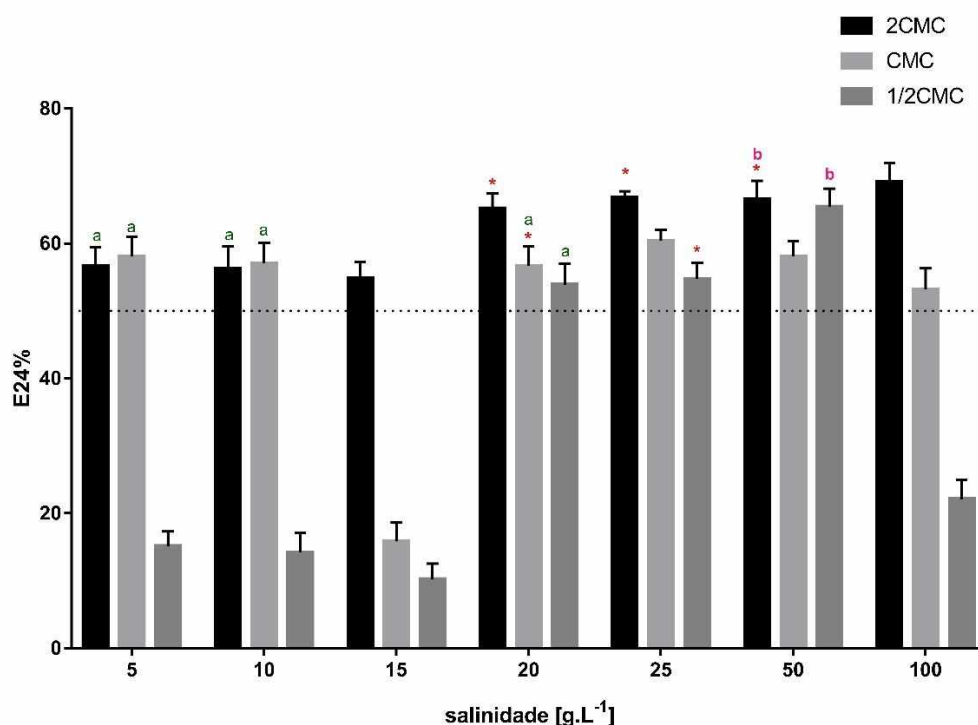


Figura 11: Índice de Emulsificação em diferentes concentrações após aplicação de estresse em várias concentrações de NaCl. * $p < 0,05$ comparado com o controle; ^a $p < 0,05$ comparado com CMC; ^b $p < 0,05$ comparado com 2CMC

Nos testes de Tensão superficial verifica-se uma estabilidade comum para todas as faixas de temperatura e salinidade, já para pH verificou-se instabilidade em pHs extremos (2 e 10). Ao ser analisado os testes de E24 houve uma estabilidade para a concentração CMC também em todas as faixas de temperatura e salinidade, e para pH essa faixa não permaneceu estável em pH 2 e 8,2.

Como citado anteriormente, é provável que o biossurfactante em estudo possui alto peso molecular, sendo preferível para uso como emulsionantes. Com os resultados obtidos, caracteriza-se a melhor faixa para operar esta biomolécula valores de temperatura entre 20 e 40 °C, pH próximos ao neutro e a salinidade de 20 a 50 g.L⁻¹, uma vez que nestas condições há um aproveitamento máximo para emulsificação e uma diminuição regular na tensão superficial.

De maneira semelhante aos resultados deste estudo, pesquisadores como Singh e Tripathi (2013), estudaram a estabilidade frente temperatura, pH e salinidade e neste caso, de um rhamnolipídio produzido por *Pseudomonas stutzeri* em dois diferentes meios, com o suplemento de carvão e sem a suplementação. Para o meio não suplementado, o surfactante mostrou 100% de emulsão para a faixa de temperatura testada, de 10 a 100

°C, pH de 4 a 8 e até 25% de NaCl. No meio suplementado com carvão, o biotensoativo indicou uma estabilidade até 100 °C, com pH de 4 a 10 e 35% de NaCl.

Com os resultados do teste de estabilidade, percebe-se a possível empregabilidade deste biossurfactante na recuperação aprimorada microbiana de petróleo, na área de drenagem ácida de minas ou onde encontra-se uma alta concentração de sais (CHANDRAN e DAS, 2010).

4.4. Biorremediação - Lavagem de solos contaminados com biossurfactante

Como descrito no item 3.8, foi determinado a capacidade de remoção de hidrocarbonetos em solos contaminados que os biossurfactantes possuem. Foi determinado a capacidade de remoção de hidrocarbonetos que os biossurfactantes possuem, em solos contaminados, tendo como resultado 50% de remoção comparado ao grupo controle.

Segundo Mulligan (2009) e Banat *et al.* (2010), muitos biossurfactantes de baixo peso molecular mostram uma alta taxa de remoção de petróleo e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) do solo, enquanto os de alto peso molecular, trazem limitadas informações de sua eficiência.

O biossurfactante produzido pelo L69 mostrou resultados não satisfatórios para a remoção total de óleo de motor do solo. Contudo, tendo em vista que houve a remoção parcial da substância, torna esses compostos potencialmente adequado para a remoção para a utilização como um coadjuvante.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e analisados, selecionou-se as melhores fontes de carbono e nitrogênio para produção do biossurfactante, as quais foram extrato de abacaxi (25 g.L^{-1}), extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$), sulfato de amônio (1 g.L^{-1}),

Não foi apresentado um resultado favorável pelo biossurfactante produzido pela *Rhodotorula mucilaginosa* na capacidade de reduzir a tensão superficial, apresentando também uma alta concentração para atingir sua concentração micelar crítica, chegando no valor de $59,14 \text{ g.L}^{-1}$. Já o teste de emulsificação apresentou bons resultados e trouxe a análise de que é viável a utilização do biossurfactante na concentração de $\frac{1}{2}\text{CMC}$, reduzindo gastos. Com os resultados de ambos os teste, infere-se a hipótese de que o BS possui um alto peso molecular.

Os testes realizados para a seleção do método mais eficiente para extração do biossurfactante produzido pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, indicaram destaque para o processo com acetona fria, com um conjunto de rendimento elevado e uma repetibilidade satisfatória ($\text{SD} = 4$).

Os experimentos para estabilidade comprovaram que esta biomolécula possui uma ampla faixa de tolerância a condições extremas, além de trazer melhores resultados para tensão superficial e índice de emulsificação a uma temperatura próxima a ambiente, exigindo menor controle das condições de cultivo.

Por fim os testes para lavagem de solo apresentam um potencial para a utilização do biossurfactante na biorremediação, contudo ainda se faz necessário estudos mais aprofundados para garantir o máximo de remoção do hidrocarboneto ou utilizando outro material coadjuvante ou mesmo otimizando o processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANAT, I. M. Biosurfactant production and use in microbial enhanced oil recovery and possible uses in pollution remediation: A Review. **Bioresource Technology**, n.51, p.1-12, 1995. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00101-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00101-6)
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 87, p. 427–444, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>
- BEAL, R.; BETTS, W. B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the up take and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Appl. Microbiol.**, [s.l.], v. 89, p. 158-168, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01104.x>
- CAI, Q.; ZHANG, B.; CHEN, B.; ZHU, Z.; LIN, W.; CAO, T.. Screening of biosurfactante producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine pollution bulletin**, [s.l.], v. 86, p. 402-410, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.039>
- COOPER, M. E. The British Law relating to Raptors. **Birds of Prey Bulletin**, [s.l.], v. 3, p. 145-148, 1986.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 79, p. 246-253, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.002>
- DE FRANÇA, Í. W. L., LIMA, A. P., LEMOS, J. A. M., LEMOS, C. G. F., MELO, V. M. M., DE SANT'ANA, H. B. & GONÇALVES, L. R. B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, [s.l.], v. 255, p. 10-15, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potentials. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. [s.l.], v. 61, p. 47-64, 1997.
- DU NOÛY, P.L. An Interfacial Tensiometer for Universal Use. **The Journal of General Physiology**, [s.l.], v. 7, p. 625-633, 1925. <https://doi.org/10.1085/jgp.7.5.625>

DUBEY, K.V.; CHARDE, P. N.; MESHRAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**. [s.l.], v. 126, p. 368-374, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.024>

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotech.**, [s.l.], v. 10, p. 208-217, 1992. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(92\)90215-H](https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90215-H)

GEORGIOU, G.; LIN, S.; SHARMA, M. M. Surface active compounds from microorganisms. **Bio/Tech.**, [s.l.], v. 10, p. 60-65, 1992. <https://doi.org/10.1038/nbt0192-60>

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Adv. Bio- chem. Engng/Biotech.**, [s.l.], v. 33, p. 53-93, 1986. <https://doi.org/10.1007/BFb0002453>

KHADYDJA, D. F. S.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Elsevier**, [s.l.], v. 54, p. 20-27, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.020>

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X. Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 367, p. 311-318, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.009>

KOGLIN, A.; DOETSCH, V.; BERNHARD, F. Molecular engineering aspects for the production of new and modified biosurfactants. **Adv Exp Med Biol**, [s.l.], v. 672, p. 158–169, 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_12

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 64, p. 1731-1737, 1993. <https://doi.org/10.1351/pac199264111731>

LANG, S.; WULBRANDT, D. Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 51, p. 22-32, 1999. <https://doi.org/10.1007/s002530051358>

LIMA, T. M.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDÃO, F. D.; CARVALHO, A. M.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, [s.l.], v. 22, p. 585–592, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9431-3>

MAIER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 54, p. 625-633, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002530000443>

PAVLOVA, K.; RUSINOVA-VIDEVA, S.; KUNCHEVA, M.; KRATCHANOVA, M.; GOCHEVA, M.; DIMITROVA, S. Synthesis and Characterization of an Exopolysaccharide by Antarctic Yeast Strain *Cryptococcus laurentii* AL100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 163, n. 8, p. 1038-1052, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9107-9>

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioemulsans: Microbial Polymeric Emulsifiers. **Current Opinion Biotechnology**, v. 8, p. 313-316, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80009-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80009-2)

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and Low- Molecular-Mass Microbial Surfactant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999. <https://doi.org/10.1007/s002530051502>

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA Jr., N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, [s.l.], v. 91, 459-467, 2001. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:459>

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: A review. **Journal of Oleo Science**, [s.l.], v. 55, p. 155-166, 2006. <https://doi.org/10.5650/jos.55.155>

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnol**, [s.l.], v. 22, p. 142-146, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>

SINGH, D. N.; TRIPATHI, A. K. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 128, p. 215-221, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.127>

SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 3, p. 132-139, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.005>

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCLNERNEY, M. J. Comparasion of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 56, p. 347-399, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>