



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(Área: MICROBIOLOGIA APLICADA)

---

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO  
HIDROCARBONETOS

MARIA PAULA SANTOS PIRÔLLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Fevereiro - 2006

# **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES UTILIZANDO HIDROCARBONETOS**

MARIA PAULA SANTOS PIRÔLLO

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus  
de Rio Claro, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração: Microbiologia Aplicada).**

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Fevereiro de 2006

# **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES UTILIZANDO HIDROCARBONETOS**

MARIA PAULA SANTOS PIRÔLLO

**Orientador: Prof. Dr. JONAS CONTIERO**

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus  
de Rio Claro, para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas (Área de  
Concentração: Microbiologia Aplicada).**

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Fevereiro de 2006

*Dedico aos meus pais e à  
minha querida família.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por te me dado forças para enfrentar os momentos mais difíceis durante a confecção deste trabalho, e por me trazer conforto e solução em momentos de desespero.

À UNESP pela formação acadêmica.

À ANP/PRH-05 pelo suporte financeiro e logístico fornecido à realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Contiero, pelo ensinamento, apoio e ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Paulo e Suely, que sempre me deram coragem, incentivo e apoio para realizar este trabalho de mestrado.

Aos meus irmãos, Luiz Gustavo e Andréia, pelo carinho e admiração.

À minha família de um modo geral, base da minha existência, que sempre torce por mim, pela minha realização profissional e sem a qual eu jamais seria a pessoa que sou.

Aos meus grandes e maravilhosos amigos, companheiros de festinhas, churrascos e almoços: Yumi, Thelma, Sammy, Rodrigo, Lye, Eduardo (Bera), Sunao e Newton. Que saudade eu sinto de todos vocês!

Às queridas amigas Adriana e Suely, que se tornaram pessoas importantíssimas na minha vida e muito queridas por mim. Sem vocês, meus dias teriam sido tão sem graça... Valeu por todas as palhaçadas! Adoro muito vocês e sempre seremos o “trio”.

Às amigas da República Margarita's, Renata (Batata) e Gabi, pelas horas alegres que passamos juntas.

Ao pessoal da salinha da ANP pelas longas horas de convivência no “Cyber”, que me rederam grandes amizades: Adriano (obrigada pela paciência e pelas ajudas quando eu dizia: Como se faz....?), Sérgio (sempre de alto astral, uma maravilha), Renata (uma doçura de menina) e Barbara (uma companheira de laboratório e amiga para o resto da vida!). Adoro todos vocês!

Ao pessoal do LMI, aos funcionários e professores do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, fundamentais para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	04
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	05
3.1 Principais acidentes envolvendo hidrocarbonetos.....	05
3.2 Biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo.....	06
3.3 Tensão superficial.....	08
3.4 Surfactantes.....	08
3.5 Biossurfactantes.....	10
3.5.1 Principais classes e microrganismos produtores.....	11
3.5.2 Fatores que influenciam a produção.....	13
3.5.3 Funções fisiológicas.....	14
3.5.4 Aplicações.....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 Microrganismo e fontes de carbono.....	21
4.2 Meio de manutenção.....	21
4.3 Preparo do microrganismo para os ensaios.....	21
4.4 Avaliação do potencial de degradação de hidrocarbonetos.....	22
4.5 Meio e condições de cultivo para produção de biossurfactantes.....	22
4.6 Determinação do crescimento celular.....	23
4.7 Determinação da concentração de ramnose.....	25
4.8 Determinação da tensão superficial e pH.....	27
4.9 Determinação do Índice de Emulsificação (E24).....	27
4.10 Avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido.....	28
4.11 Análise dos elementos inorgânicos da borra oleosa.....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
5.1 Ensaio preliminar em tubos de ensaios.....	29
5.2 Influência da fonte de carbono sobre o crescimento celular e produção de biossurfactantes nos ensaios em mesa agitadora.....	30
5.2.1 Ensaios com benzeno e tolueno.....	30
5.2.2 Ensaios com querosene.....	32
5.2.3 Ensaios com óleo diesel.....	38
5.2.4 Ensaios com petróleo.....	43
5.2.5 Ensaios com borra oleosa.....	45
5.3 Análise comparativa entre os ensaios.....	49
5.4 Determinação do Índice de Emulsificação (E24).....	52
5.5 Avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido.....	53
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	57

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido.....	08
<b>Figura 2.</b> Esquema da tensão superficial, interfacial e solubilização em função da concentração de surfactantes.....	09
<b>Figura 3.</b> Estruturas dos ramnolipídeos 1-4.....	13
<b>Figura 4.</b> Curva padrão de soroalbumina bovina x absorbância.....	25
<b>Figura 5.</b> Curva padrão de concentração de ramnose x absorbância.....	27
<b>Figura 6.</b> Ensaios com o indicador redox- 2,6 diclorofenol indofenol.....	29
<b>Figura 7.</b> Efeito das concentrações de querosene sobre o crescimento celular durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8.....	33
<b>Figura 8.</b> Meios de cultivos com querosene.....	34
<b>Figura 9.</b> Produção de biossurfactantes em termos de ramnose durante cultivo durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de querosene.....	35
<b>Figura 10.</b> Variações da tensão superficial inicial e final durante os ensaios a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de querosene.....	37
<b>Figura 11.</b> Variações de pH durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de querosene.....	38
<b>Figura 12.</b> Efeito das concentrações de óleo diesel sobre o crescimento celular durante o cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8.....	39
<b>Figura 13.</b> Meios de cultivos contendo óleo diesel.....	40
<b>Figura 14.</b> Produção de biossurfactante em termos de ramnose durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de óleo diesel.....	40
<b>Figura 15.</b> Variações da tensão superficial inicial e final durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de óleo diesel.....	41
<b>Figura 16.</b> Variações de pH durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de óleo diesel.....	42
<b>Figura 17.</b> Efeito da concentração do petróleo sobre o crescimento celular durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8.....	43
<b>Figura 18.</b> Produção de biossurfactantes em termos de ramnose durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de petróleo.....	43
<b>Figura 19.</b> Variações na tensão superficial inicial e final durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de petróleo.....	44
<b>Figura 20.</b> Variações de pH durante cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de petróleo.....	45
<b>Figura 21.</b> Crescimento celular em cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.....	47
<b>Figura 22.</b> Produção de biossurfactantes em termos de ramnose em cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.....	48

<b>Figura 23.</b> Variações na tensão superficial inicial e final durante o cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.....	48
<b>Figura 24.</b> Variações de pH durante o cultivo a 30 <sup>0</sup> C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.....	49
<b>Figura 25.</b> Controles do estudo de emulsificação.....	52
<b>Figura 26.</b> Emulsificação dos hidrocarbonetos avaliados.....	52
<b>Figura 27.</b> Aquecimento do caldo de cultivo contendo biossurfactante a 100 <sup>0</sup> C em diferentes intervalos de tempo.....	53
<b>Figura 28.</b> Caldo de cultivo contendo o biossurfactante submetido a valores diferentes de pH.....	54
<b>Figura 29.</b> Condição salina e pressão sobre o caldo de cultivo contendo biossurfactante.....	54

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.....	12
<b>Tabela 2.</b> Funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.....	20
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem de redução da tensão superficial nos ensaios com querosene.....	37
<b>Tabela 4.</b> Porcentagem de redução da tensão superficial nos ensaios com óleo diesel.....	42
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem de redução da tensão superficial nos ensaios com petróleo.....	44
<b>Tabela 6.</b> Análise de elementos inorgânicos na borra oleosa, apresentados em porcentagem.....	46
<b>Tabela 7.</b> Análise de elementos inorgânicos da borra oleosa, apresentados em ppm.....	46
<b>Tabela 8.</b> Porcentagem de redução da tensão superficial nos ensaios com petróleo.....	49
<b>Tabela 9.</b> Comparação entre os valores máximos de produção de proteína celular nos diferentes ensaios.....	50
<b>Tabela 10.</b> Comparação entre os valores máximos de produção de ramnose nos diferentes ensaios.....	50
<b>Tabela 11.</b> Comparação entre os valores finais e porcentagem de redução da tensão superficial nos diferentes ensaios.....	51
<b>Tabela 12.</b> Porcentagem de emulsificação.....	53

## RESUMO

Os biossurfactantes são compostos tensoativos sintetizados por microrganismos quando cultivados em diferentes fontes de carbono e suas aplicações são em biorremediação, biodegradação, limpeza de reservatórios de óleos, recuperação terciária do petróleo, entre outras. Características do biossurfactante como, quantidade produzida, poder de ação emulsificadora, desempenho sob condições extremas foram avaliadas com a realização de experimentos em escala laboratorial simulando contaminação de águas utilizando benzeno, tolueno, querosene, óleo diesel e petróleo em diferentes concentrações, em ensaios independentes. A cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* LBI, isolada de solo contaminado com hidrocarbonetos, foi inoculada visando promover a degradação dos hidrocarbonetos através da capacidade de produção de biossurfactantes. Como matéria prima alternativa de baixo custo para produção de biossurfactantes utilizou-se a borra oleosa proveniente do fundo de tanques de estocagem da REPLAN-PETROBRAS. Os ensaios foram realizados em triplicatas a 30°C, 200 rpm, durante 168 horas e o acompanhamento foi realizado por amostras a cada 24 horas para quantificar o biossurfactante e o crescimento celular. A tensão superficial, pH e os estudos de estabilidade e emulsificação foram realizados com o sobrenadante do cultivo de 168 horas. A cepa bacteriana mostrou-se capaz de se desenvolver e produzir biossurfactante em querosene, óleo diesel, petróleo e borra oleosa. Apenas benzeno e tolueno não apresentaram resultados positivos. Na presença de óleo diesel a 30%, produziu a maior quantidade de biossurfactante observada. Através do estudo de emulsificação, foi possível comprovar a capacidade do biotensoativo de emulsificar diferentes hidrocarbonetos. Os estudos de estabilidade em condições de temperatura, pH, pressão e salinidade demonstraram que o composto tensoativo produzido não sofre alterações. Conclui-se que a cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* LBI e o biossurfactante produzido possuem potencial de utilização em biorremediação de áreas impactadas com hidrocarbonetos e possível aplicação para recuperação terciária do petróleo.

**Palavras-chave:** Biossurfactante, hidrocarbonetos, borra oleosa, *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

Biosurfactants are compounds surface-active produced microbially. The ability of the biosurfactant producers to reduce interfacial surface tension has important tertiary oil recovery and bioremediation consequences. The biosurfactant synthesis, emulsification power, stability in extreme conditions from laboratory experiments simulating water contamination with benzene, toluene, kerosene, diesel oil and oil crude at different concentration was studied in this work. *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from hydrocarbon contaminated soil and potential producer of biosurfactant was used for hydrocarbon biodegradation. The petroleum waste from REPLAN – PETROBRAS, alternative source of low cost to biosurfactant synthesis was utilized on medium culture. These studies were done at 30<sup>0</sup>C with shaking at 200 rpm, during 168 hours, in triplicate. The samples were withdrawn daily for growth studies and biosurfactant production. The surface tension, pH and stability studies were done with the cell-free broth after 168 hours of incubation. The strain was able to produce biosurfactants and to grow on the analyzed carbon sources, except benzene and toluene. When cultivated on diesel oil 30%, the strain produced higher quantities of biosurfactant. The biosurfactant was able to emulsifier all analyzed hydrocarbons. Stability studies of the product on the culture broth indicate that the biosurfactant is stable in extreme conditions. Therefore the strain *Pseudomonas aeruginosa* LBI and the biosurfactant produced have potential applications in bioremediation of site hydrocarbon contaminated, and possible application in enhanced oil recuperation.

**Key words:** Biosurfactant, hydrocarbon, petroleum waste, *Pseudomonas aeruginosa*.

## 1. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma mistura complexa de compostos não-aquosos e hidrofóbicos como n-alcanos, aromáticos, resinas e asfaltenos (RAHMAN et al., 2003) utilizado desde 5.000 anos a.C. pelas antigas civilizações do Egito, Fenícia, Mesopotâmia, Pérsia, China e nas Américas pelos Incas e Astecas.

Da história antiga chega-se à história moderna. A "era da propulsão mecânica", iniciada em 1887 com a invenção dos motores à explosão, passou a utilizar a gasolina e o diesel como combustível. A indústria petroquímica surgiu em 1930, possibilitando a utilização de derivados do petróleo como componentes de explosivos (glicerina e tolueno), matéria sintética para roupas, solventes, medicamentos, entre outros, que tiveram muita utilidade na Segunda Guerra Mundial (1939-1945) e que são utilizados até hoje. Da década de trinta até os dias atuais, a indústria do petróleo cresce progressivamente, conseqüentemente, são liberados cada vez mais petróleo, seus derivados e resíduos oleosos ao meio ambiente, provenientes dos motores e das lavagens de tanques de navios cargueiros, petroleiros e pesqueiros, da descarga de água de lastro, e os vazamentos provenientes das operações de carga e descarga nos portos e terminais (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB, 2005).

A poluição ambiental causada pela liberação de hidrocarbonetos, decorrente das atividades industriais e dos derramamentos acidentais de petróleo e seus derivados, apresenta grande risco aos ecossistemas marinho e terrestre. Os tratamentos tradicionais,

tais como contenção e recolhimento através de barreiras flutuantes, adsorção por materiais naturais ou sintéticos, entre outros, não visam à degradação do petróleo.

A biodegradação apresenta-se como um método efetivo, uma vez que, o petróleo é usado como fonte de carbono através dos processos microbianos, resultando na quebra das moléculas em compostos de baixa massa molecular (ZHANG et al., 2005). Porém, geralmente a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos para a conversão microbiana é baixa, limitando assim, a taxa de biodegradação no meio aquoso. A dispersão e/ou a solubilização de compostos orgânicos que apresentam baixa solubilidade em água é um passo importante para a biorremediação (IQBAL et al., 1995), e o uso de compostos tensoativos, tal como biossurfactantes, apresenta uma melhora na biodegradação dos hidrocarbonetos (URUM et al., 2004).

Muitas bactérias são capazes de emulsificar hidrocarbonetos em solução através da produção de biossurfactantes (KOCH et al., 1991) aumentando a adesão de células ao substrato (BALDI et al., 1999).

Os biossurfactantes são compostos formados por moléculas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que através de seu acúmulo nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) reduzem as tensões superficial e interfacial aumentando a área superficial de compostos insolúveis, permitindo o aumento da mobilidade, biodisponibilidade e subsequente biodegradação. São compostos com baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000), com possibilidade de produção *in situ* e a partir de fontes renováveis. Apresentam as mesmas propriedades dos surfactantes químicos, tais como emulsificação, capacidade espumante, capacidade molhante, lubrificação, detergência, dispersão e solubilização de fases (DESAI e BANAT, 1997), sendo sua aceitabilidade ecológica a vantagem mais importante sobre os surfactantes químicos (HABA et al., 2000).

As aplicações dos biossurfactantes estão voltadas atualmente para a indústria petrolífera, na recuperação terciária do petróleo e biorremediação de hidrocarbonetos. Também são relatadas a solubilização e emulsificação de compostos químicos tóxicos. Os biossurfactantes também apresentam aplicações nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, tintas, alimentícias, produtos de limpeza, na agricultura entre outras (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000).

A economia é frequentemente o gargalo dos processos biotecnológicos, especialmente para a produção de biossurfactantes. O sucesso da produção depende do desenvolvimento de processos mais baratos e do uso de materiais renováveis e de baixo custo, que resultam numa redução de 10-30% do custo total (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998). Há estudos envolvendo a utilização de substratos alternativos, principalmente os solúveis em água, como melaço, água de maceração de milho, soro de leite e etanol para a produção de biossurfactante (PATEL e DESAI, 1997; DANIEL et al., 1999; MATSUFUJI et al., 1997). Entretanto, a utilização de resíduos hidrofóbicos como matéria prima de baixo custo é observada em apenas alguns estudos (HABA et al., 2000; BENINCASA, 2002; MERCADÉ et al., 1993).

A hipótese deste estudo situa-se no fato de que a cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI, isolada de solo contaminado por hidrocarbonetos, pode ser um microrganismo eficiente para a biodegradação de petróleo e seus derivados, e também para a produção de biossurfactantes a partir de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo. Caso a hipótese esteja correta, a utilização do microrganismo em locais impactados por hidrocarbonetos contribuirá para uma maior eficácia no processo de biorremediação e a produção a partir de resíduos de petróleo acarretará uma redução considerável no custo de produção dos biossurfactantes.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar a produção de biossurfactantes pela cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de hidrocarbonetos como fonte de carbono.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar previamente a capacidade da cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI em biodegradar benzeno, tolueno, querosene, óleo diesel, petróleo e borra oleosa;
- Verificar a influência da concentração dos hidrocarbonetos sobre o desenvolvimento bacteriano e no processo de produção de biossurfactantes;
- Verificar a possibilidade da utilização de borra oleosa proveniente de fundo de tanques de estocagem, como matéria prima alternativa de baixo custo para a produção de biossurfactantes;
- Avaliar o poder de emulsificação do biossurfactante frente a uma série de hidrocarbonetos;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido frente a condições de pH, temperatura, pressão e salinidade marinha.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Principais acidentes envolvendo hidrocarbonetos**

Nos últimos anos, vários acidentes com derramamento de petróleo e derivados têm resultado na contaminação de ambientes terrestres e aquáticos.

Os pequenos vazamentos provenientes do transporte marítimo correspondem a 98% das perdas totais de petróleo e derivados. As perdas acidentais correspondem aos 2% restantes, que contribuem com o lançamento de aproximadamente 400 mil ton/ano de óleo no meio ambiente. São esses grandes vazamentos que mais chamam atenção. O primeiro caso conhecido foi em 1967, envolvendo o encalhe do navio Torrey Canyon derramando 123 mil toneladas de petróleo na zona costeira da Inglaterra e França, causando mortandade de aves e prejuízos à pesca e ao turismo. Em 1978 ocorreu o encalhe do navio Amoco Cadiz, também na costa da Inglaterra, liberando 230 mil toneladas de petróleo ao mar, que provocaram um grande desastre ambiental. Em 1983, ocorreu o vazamento de 260 mil toneladas de petróleo do navio Castillo de Belver, na África do Sul, e em 1989, 40 mil toneladas de óleo vazaram do navio Exxon Valdez, no Alasca (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB, 2005).

No Brasil, o primeiro grande episódio conhecido ocorreu em 1974, quando o petroleiro Takimya Maru colidiu-se com uma rocha no Canal de São Sebastião, causando o vazamento aproximado de 6 mil toneladas de petróleo. No ano seguinte, ocorreu o acidente com o navio Tarik Ibn Zviad, e essa mesma quantidade de óleo foi

derramada na Baía de Guanabara–RJ. Até os dias atuais, muitos outros acidentes aconteceram causando maiores vazamentos de petróleo, tais como 3 milhões de litros em Bertioga–SP em 1983, 2,8 milhões de litros nos manguezais da Baía de Guanabara em 1997, 1,3 milhões de litros novamente na Baía de Guanabara em 2000, 4 milhões de litros nos rio Barigui e Iguçu, no Paraná em 2000 (CETESB, 2005).

Diante de tantos acidentes envolvendo petróleo e das legislações de caráter ambiental que, cada vez mais, exigem a substituição e adequação de tecnologias com vistas à preservação ambiental, surgem caminhos onde a biotecnologia assume um papel fundamental.

### **3.2 Biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo**

Os hidrocarbonetos incluem compostos formados por carbono e hidrogênio com propriedades químicas e físicas definidas pelo número de átomos e arranjo das moléculas. O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos que podem ser divididos em quatro frações: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos. A fração dos compostos saturados inclui os n-alcenos, alcenos ramificados (isoalcenos) e cicloalcenos. A fração aromática contém hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis como benzeno, tolueno e xileno; os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs); os nafteno-aromáticos; e compostos de enxofre, tais como tiofenos e dibenzotiofenos. As resinas e a fração asfalteno consistem de moléculas polares contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio. As resinas caracterizam-se por serem sólidos amorfos dissolvidos no óleo, enquanto os asfaltenos apresentam-se como grandes moléculas coloidais, dispersas no óleo. A proporção destas frações no petróleo depende de fatores tais como fonte, história geológica, idade, migração ou alteração do mesmo (BALBA et al., 1998).

Muitos microrganismos possuem a capacidade enzimática para degradar hidrocarbonetos do petróleo. Alguns microrganismos degradam alcenos (normal, ramificado, cíclico), outros aromáticos, e ainda outros degradam tanto hidrocarbonetos aromáticos quanto alcenos. Frequentemente, os n-alcenos com número de carbonos variando entre C<sub>10</sub> a C<sub>26</sub> são prontamente degradados, assim como os compostos tóxicos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno. A biodegradação de petróleo no ambiente marinho é realizada por uma grande diversidade de populações bacterianas, incluindo várias espécies de *Pseudomonas* (ATLAS, 1995).

O petróleo nunca é completamente degradado e sempre deixa algum resíduo complexo, que frequentemente apresenta-se como um piche preto contendo uma alta proporção de compostos asfálticos. Entretanto possui baixa toxicidade e biodisponibilidade, tornando-se contaminantes inertes no meio ambiente (ATLAS, 1995). Os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original, e portanto existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (ROSATO, 1997).

A principal via metabólica de biodegradação de hidrocarbonetos já foi esclarecida. O passo inicial para a biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular. Os alcanos geralmente são convertidos a ácidos carboxílicos que posteriormente são biodegradados pelo processo de  $\beta$ -oxidação. A biodegradação de compostos aromáticos requer uma reação de dihidroxilação com a formação de diols, seguida da clivagem do anel e a formação de catecol que posteriormente é degradado em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Os fungos formam *trans*-diols, e muitos deles são potentes carcinogênicos, enquanto que bactérias quase sempre formam *cis*-diols que não são biologicamente ativas (ATLAS, 1995).

O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO<sub>2</sub> na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados como glóbulos e alguns alcanos podem ser incorporados como biomassa, ou convertidos para a produção de diferentes lipídeos aplicáveis na indústria oleoquímica (ROSATO, 1997).

Compostos como o tolueno e o fenol encontrados no petróleo, são usados como desinfetantes. A ação dos componentes pode ser bacteriostática ou bactericida para os microrganismos, dependendo da concentração. O tolueno, por exemplo, pode estimular o crescimento de microrganismos em baixa concentração, mas mostra ação bacteriostática em alta concentração. Os produtos da oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos podem ser mais tóxicos que os compostos originais (ROSATO, 1997).

As refinarias de petróleo geram uma grande quantidade de derivados indesejáveis, que poluem o ambiente e são os principais poluidores do solo e mananciais de água. As fontes desses produtos são provenientes principalmente do fundo de tanques-reservatórios e das unidades de tratamento (ROSATO, 1997).

### 3.3 Tensão superficial

Os líquidos tendem a adotar uma forma que minimize sua área de superfície, numa tentativa de manter as moléculas com um maior número possível de vizinhos semelhantes. As gotas de líquidos tendem a assumir a forma esférica, pois a esfera é a forma com a menor razão superfície/volume. As forças coesivas entre as moléculas no interior de um líquido são compartilhadas com os átomos vizinhos. Aquelas da superfície não têm átomos vizinhos acima delas, e exibem uma força atrativa mais forte sobre suas vizinhas mais próximas na superfície. Este aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície é chamado tensão superficial (Figura 1).

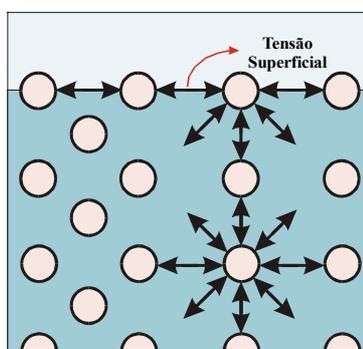


Figura 1- Esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido.

A tensão superficial entre as interfaces ar/água e óleo/água podem ser medidas facilmente utilizando-se um tensiômetro. A tensão superficial da água destilada é 72 mN/m, e a adição de surfactante reduz este valor para 30 mN/m. Quando um surfactante é adicionado a sistemas ar/água ou óleo/água em concentrações crescentes, observa-se uma redução na tensão superficial até um valor crítico, a partir do qual as moléculas de surfactante se associam formando estruturas supramoleculares como micelas, bicamadas e vesículas. Este valor é conhecido como concentração micelar crítica (CMC) e é usado comumente para medir a eficiência do surfactante (DESAI e BANAT, 1997).

### 3.4 Surfactantes

Os surfactantes são compostos formados por moléculas que possuem uma parte hidrofóbica e uma hidrofílica, que tendem à separação preferencialmente na interface

entre fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tais como interfaces óleo/água ou ar/água. Atuam nas tensões superficial e interfacial e formam microemulsões onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água e vice versa. A eficácia dos surfactantes é determinada através da capacidade de reduzir a tensão superficial, que é a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (ROSEN, 1978 apud MULLIGAN, 2005). Devido à presença de surfactantes, menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida. Por exemplo, um bom surfactante pode reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial entre água e n-hexadecano de 40 para 1 mN/m. A tensão superficial correlaciona-se com a concentração dos compostos tensoativos até o momento em que a concentração micelar crítica (CMC) é alcançada (Figura 2). A CMC é definida como a solubilidade de um tensoativo na fase aquosa, ou seja, a concentração mínima de tensoativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, a partir da qual se inicia a formação de micelas. Surfactantes eficientes apresentam baixa concentração micelar crítica, ou seja, menos surfactante é necessário para reduzir a tensão superficial (BECHER, 1965 apud MULLIGAN, 2005).

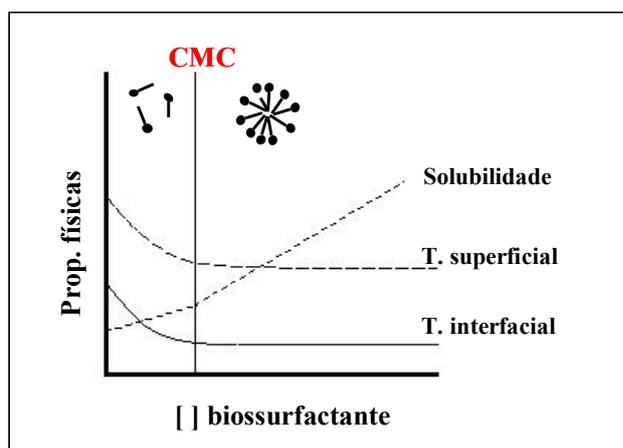


Figura 2 - Tensão superficial, interfacial e solubilização em função da concentração de surfactantes (MULLIGAN, 2005).

Com estas características os surfactantes são considerados um dos produtos químicos mais versáteis e utilizados nos diversos setores industriais (DESAI e BANAT,

1997). Entretanto, estes compostos químicos são prejudiciais ao meio ambiente, pois são tóxicos e não apresentam biodegradabilidade.

### **3.5 Biossurfactantes**

Os biossurfactantes são produzidos principalmente pelo crescimento aeróbio de microrganismos em meios aquosos a partir de carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou uma mistura destes. Quando são excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999). Porém, alguns microrganismos mantêm os biossurfactantes associados à parede celular, facilitando a penetração dos hidrocarbonetos no espaço periplasmático (KOCH et al., 1991).

Apresentam as mesmas características dos surfactantes químicos, reduzem as tensões interfacial e superficial, tanto em soluções aquosas quanto em misturas de hidrocarbonetos. Possuem uma estrutura comum, onde a porção hidrofílica pode ser composta de aminoácidos ou peptídeos, mono, di ou polissacarídeos, enquanto a porção hidrofóbica é constituída de uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, saturados ou insaturados (DESAI e BANAT, 1997).

São muitas as vantagens apresentadas pelo biossurfactante quando comparado aos de origem sintética, tais como (KOSARIC, 2001):

- alta biodegradabilidade;
- baixa toxicidade;
- biocompatibilidade e biodigestibilidade, que permitem suas aplicações em cosméticos, produtos farmacêuticos e como aditivos em alimentos;
- possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais;
- especificidade de aplicações, já que são moléculas orgânicas complexas, com grupos funcionais específicos;
- uso em biorremediação de locais impactados por óleo e biodegradação e detoxificação de efluentes industriais;
- eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

### 3.5.1 Principais classes e microrganismos produtores

Enquanto os surfactantes químicos são classificados de acordo com a natureza de seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes incluem: glicolipídeos, fosfolipídeos, lipopeptídeos ou lipoproteínas (DESAI e DESAI, 1993).

De acordo com Rosenberg e Ron (1999), os biossurfactantes também podem ser classificados a partir de sua massa molar:

- **Baixa massa molar:** os glicolipídeos, que são os mais conhecidos, são formados por carboidratos e ácidos graxos alifáticos de cadeia longa (ex: ramnolipídeos, trealolipídeos, soforolipídeos) e os lipopeptídeos (ex: surfactina, gramicidina S e polimixina).
- **Alta massa molar:** polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos (emulsans), lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros.

As classes de biossurfactantes e microrganismos produtores estão distribuídos entre uma extensa variedade de gêneros, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos (DESAI e BANAT, 1997).

<b>Tipo de Biossurfactante</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>GLICOLIPÍDEOS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Ramnolipídeos</li> <li>▶ soforolipídeos</li> <li>▶ trealolipídeos</li> </ul>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp</i>
<b>LIPOPEPTÍDEOS E LIPOPROTEÍNAS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ peptídeo-lipídeo</li> <li>▶ viscosina</li> <li>▶ serrawetina</li> <li>▶ surfactina</li> <li>▶ subtilisina</li> <li>▶ gramicidina</li> <li>▶ polimixina</li> </ul>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
<b>ÁCIDOS GRAXOS, LIPÍDEOS NEUTROS E FOSFOLIPÍDEOS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ ácidos graxos</li> <li>▶ lipídeos neutros</li> <li>▶ fosfolipídeos</li> </ul>	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>SURFACTANTES POLIMÉRICOS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ emulsan</li> <li>▶ biodispersan</li> <li>▶ liposan</li> <li>▶ carboidrato-lipídeo-proteína</li> <li>▶ manana-lipídeo-proteína</li> </ul>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i>
<b>SURFACTANTES PARTICULADOS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ vesículas</li> <li>▶ células</li> </ul>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias

Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas* spp. são extensamente estudados. Consistem de uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo, com 8-12 átomos de carbono, que podem ser saturados ou insaturados (SIM et al., 1997). Reduzem a tensão superficial a valores entre 25-30 mN/m e a interfacial a 1 mN/m contra hexadecano (PARRA et al., 1989).

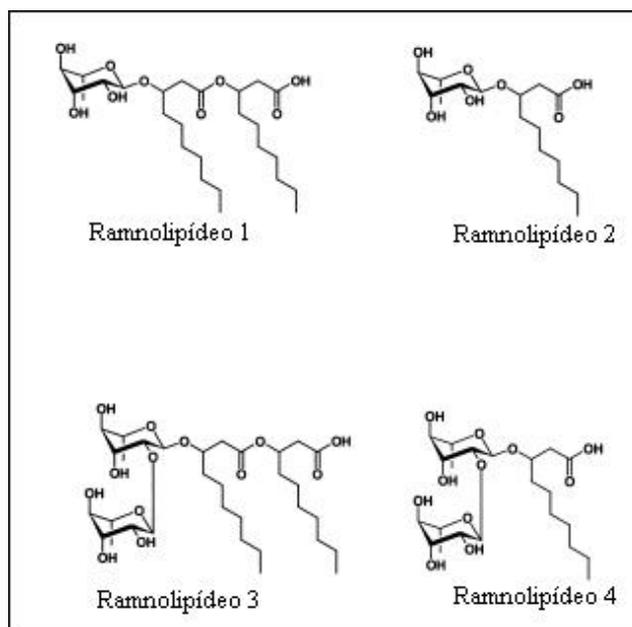


Figura 3 – Estruturas dos ramnolipídeos 1-4 (TUMMLER, EFFENBERGER e SYLDATK, 2003).

### 3.5.2 Fatores que influenciam a produção

A quantidade e qualidade dos biossurfactantes produzidos pelas diversas espécies de microrganismos são influenciadas tanto pela fonte de carbono quanto pelas concentrações de nitrogênio, fósforo, manganês e ferro no meio, além das condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação (BANAT, 1995). Os parâmetros utilizados para medir a eficiência dos biossurfactantes são: redução da tensão superficial, redução da tensão interfacial, emulsificação e concentração micelar crítica (DESAI e BANAT, 1997). Zhang e Miller, 1992, apud Benincasa et al., 2004, relatam que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a CMC está tipicamente entre 1 a 200 mg/L. Estudos são realizados para definir a melhor relação entre carbono, nitrogênio, fósforo e ferro para se obter alta produção de ramnolipídeos.

Após o total consumo de nitrogênio do meio de cultivo, o microrganismo dirige seu metabolismo celular para a produção de biossurfactantes, que aumenta após a fase exponencial de crescimento (BENINCASA et al., 2002).

A produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PA1 foi avaliada usando como substrato n-hexadecano, petróleo, óleo de babaçu e glicerol por Santa Anna et al., 2002, e obteve-se respectivamente 130, 260, 200 e 690 mg/L de ramnose. O alto valor obtido

com glicerol era esperado, já que esta fonte de carbono é solúvel, sendo assim, facilmente degradada pelo microrganismo quando comparada com as demais. Quanto à fonte de nitrogênio, o nitrato de sódio apresentou melhores resultados quando comparado com uréia e sulfato de amônio. Este microrganismo mostrou habilidade em utilizar também frutose, glicose, manitol, manose, glicerol e ácido lático, que são boas fontes de carbono para a produção de ramnolipídeos.

Embora a produção de ramnolipídeos a partir de substratos puros seja bem estudada, pouquíssimos trabalhos a partir de substratos renováveis e de baixo custo são disponíveis. A utilização de melaço como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, por *Pseudomonas aeruginosa* GS3 foi avaliada por Patel e Desai (1997). A linhagem mostrou-se perfeitamente capaz de utilizar essas fontes renováveis e relativamente de baixo custo, para a produção de biossurfactante, sem adição de nutrientes. Utilizando-se 7% (v/v) de melaço e 0,5% (v/v) de água de maceração de milho, obteve-se 0,24 g/L de ramnose após 96 horas de incubação. A tensão interfacial contra petróleo foi reduzida de 21 para 0,47 mN/m, e o teste de emulsificação apresentou emulsões estáveis para n-alcanos, aromáticos, petróleo e óleos vegetais.

Os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes sintéticos devido ao seu alto custo de produção e, para que possam competir significativamente no mercado, devem ser seguidos dois pré-requisitos: 1) aumentar o conhecimento e a habilidade em manipular o metabolismo de microrganismos produtores, de forma que substratos de baixo custo possam ser usados; 2) otimização de tecnologias de processo para facilitar a recuperação do produto (FIECHTER, 1992).

### **3.5.3 Funções fisiológicas**

Considerando-se a grande diversidade de microrganismos produtores e de substratos utilizados, espera-se que as classes de biossurfactantes apresentem propriedades e funções fisiológicas diferentes. As principais funções fisiológicas incluem a emulsificação e solubilização dos substratos imiscíveis em água, tornando-o rapidamente disponível para o metabolismo microbiano. Outra função destes agentes é o efeito antibiótico sobre vários microrganismos que competem por alimento. Através da

produção destes compostos, o crescimento do microrganismo produtor é privilegiado (FIECHTER, 1992).

A natureza insolúvel de substratos como os n-alcenos e outros hidrocarbonetos em meio aquoso, requer a existência de mecanismos que facilitem seu consumo. Estes substratos devem ser transportados de alguma forma para atingir o contato com a célula. Três formas de transporte de hidrocarbonetos até as células são consideradas (GOSWAMI et al., 1990):

➤ Interação das células com hidrocarbonetos dissolvidos na fase aquosa: aplica-se quase que exclusivamente à hidrocarbonetos de cadeia curta, pois a dissolução de alcanos de cadeia longa em meio aquoso, através de processos físicos, é muito lenta e estas condições não favoreceriam o desenvolvimento celular.

➤ Contato direto das células com grandes gotas de hidrocarbonetos: ocorre quando as células microbianas aderem à superfície das gotas de hidrocarbonetos maiores que as próprias células, sendo o substrato consumido por difusão. A área superficial para a adesão das células seria o fator limitante para o consumo de substrato neste caso. A emulsificação dos hidrocarbonetos através da produção de agentes biossurfactantes aumentaria a superfície entre estas duas fases.

➤ Interação das células com gotas de hidrocarbonetos pseudosolubilizadas: as células interagem com partículas de hidrocarbonetos pseudosolubilizadas, bem menores que as células.

Ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI inibem o crescimento de algumas bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* e alguns fungos fitopatogênicos como *Penicillium*, *Alternaria*, *Gliocadium virens* e *Chaetonium globosum* (BENINCASA et al., 2004).

### 3.5.4 Aplicações

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações na área petrolífera incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagens e a recuperação terciária do petróleo. Grande parte do biossurfactante

produzido (400-500 toneladas/ano) é usada nas aplicações relacionadas ao petróleo (BOGNOLO, 1999). Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais.

- **Biorremediação**

Os vários componentes do petróleo são alcanos, cicloalcanos, aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), asfaltenos e resinas, sendo os alcanos de baixa massa molar os mais facilmente degradados pelos microrganismos (MULLIGAN, 2005). O petróleo contém compostos inibitórios do crescimento, mutagênico e carcinogênico que causam sérios danos ao ambiente aquático e terrestre. Estima-se que 0,08-0,46% do total de petróleo produzido é lançado no meio ambiente, eventualmente causando poluição de águas e praias (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes aumentam a interação superficial água/óleo, e dessa forma, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos e promovem a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995). A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo é um processo complexo que depende da natureza e quantidade de óleo ou hidrocarbonetos presentes. Além disso, o crescimento de microrganismos sobre hidrocarbonetos apresenta problemas particulares, pois estes são imiscíveis em água. Porém, muitas bactérias são capazes de produzir agentes biossurfactantes (KOCH et al., 1991; BENINCASA et al., 2002), como as espécies de *Pseudomonas*, (BENINCASA et al., 2002) que aumentam a adesão de células ao substrato (BALDI et al., 1999) permitindo a degradação. A biorremediação pode ser feita utilizando os biossurfactantes diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser adicionados diretamente os microrganismos produtores ou fontes de nutrientes para promover o crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos (LANG e WAGNER, 1993).

Goswami et al., 1990, estudaram a forma de degradação de n-hexadecano durante o crescimento de duas espécies de *Pseudomonas*. Ao aplicarem ao meio de cultivo o EDTA, um conhecido inibidor de pseudosolubilização de hidrocarbonetos, o crescimento de *Pseudomonas* M1 não foi inibido. Este fato demonstra que o consumo do substrato por este microrganismo não está envolvido com a pseudosolubilização do hidrocarboneto nem os mediadores extracelulares. Neste caso, o consumo do substrato

ocorreu através da adesão das células à interface hidrocarboneto/água promovida pela agitação do sistema. Resultados opostos foram obtidos quando aplicaram EDTA ao meio de cultivo de *Pseudomonas* N1. Neste caso o crescimento foi fortemente inibido pela adição de 5 mM do agente quelante, indicando que o desenvolvimento deste microrganismo está associado com a produção extracelular de biossurfactantes, e que a pseudosolubilização do hidrocarboneto é o fator dominante no consumo do substrato.

Vários estudos examinaram o efeito de ramnolipídeos na biodegradação de contaminantes orgânicos, enfocando principalmente vários hidrocarbonetos de baixa solubilidade.

Itoh et al. (1971) observaram muitas linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* crescendo sobre n-parafina, produzindo dois tipos de ramnolipídeos (R1 e R2). Entre as 19 linhagens analisadas, KY-4025 foi escolhida como a melhor linhagem produtora de biossurfactantes a partir do consumo vigoroso de n-parafina. No ano seguinte, Itoh e Suzuki (1972) visando encontrar evidências para uma possível função daqueles ramnolipídeos na utilização de n-parafina, utilizaram a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* KY-4025 e mutantes produzidas a partir do tratamento químico destas células. As células expostas a este tratamento foram plaqueadas em ágar-nutriente, obtendo-se aproximadamente 300 colônias, que foram avaliadas em meio líquido contendo 4% de n-parafina. Entre as possíveis mutantes assim avaliadas, apenas duas linhagens exibiram crescimento insignificante, e foram denominadas PU-1 e PU-2. Os crescimentos celulares de PU-1 e KY-4025 foram comparados em meio mínimo contendo n-parafina como única fonte de carbono, com ou sem a adição de ramnolipídeos. A linhagem KY-4025 apresentou um crescimento relativamente alto ( $3,0 \times 10^9$  UFC/mL) utilizando n-parafina, sem nenhum suplemento, provavelmente por que ela produziu considerável quantidade de ramnolipídeos durante o crescimento. A adição de 25-30 $\mu$ g/mL de ramnolipídeos ao meio de cultivo, estimulou o crescimento da KY-4025 ( $3,5 \times 10^9$  UFC/mL), mas não se mostrou essencial. Entretanto, o estímulo do crescimento foi mais notável quando a linhagem PU-1 (mutante deficiente em utilizar n-parafina) foi incubada com os ramnolipídeos, fato que levou este mutante a apresentar um crescimento ( $2,3 \times 10^9$  UFC/mL) semelhante a linhagem KY-4025. Isto sugere que o mutante é deficiente na atividade sintética de ramnolipídeos e conseqüentemente perdeu a capacidade original de utilizar n-parafina. Entretanto, pode-se supor que a

atividade enzimática responsável pela oxidação de n-parafina não foi afetada, já que o mutante foi capaz de crescer normalmente quando suplementado com ramnolipídeos. Deste modo, observou-se que os ramnolipídeos são fatores importantes requeridos para a degradação de n-parafina por *Pseudomonas aeruginosa*.

Shim e Yang (1999) analisaram a degradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) presentes em grande quantidade no petróleo. Utilizaram uma cultura mista de *P. putida* e *P. fluorescens* e observaram que tal cultura utilizou os compostos para o crescimento celular, durante o qual promoveram a degradação. Porém, o crescimento celular cessou antes do consumo total das fontes de carbono, fato este que pode ser explicado devido à condição de hipóxia durante o experimento.

Barathi e Vasudevan (2001) utilizaram *Pseudomonas fluorescens*, isolada de solo contaminado por petróleo, para verificarem a habilidade deste microrganismo em utilizar diversos compostos de hidrocarbonetos. Observaram que hexadecano foi utilizado como a principal fonte de carbono, seguido por hexano, decano, querosene e óleo cru. O biossurfactante produzido por este microrganismo emulsificou tolueno, hexano, óleo de girassol e querosene, assim como também compostos poliaromáticos, tais como naftaleno e fenantreno.

- **Limpeza de reservatórios de petróleo**

Resíduos e frações pesadas de petróleo que sedimentam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção geralmente requer lavagem com solventes ou limpeza manual, ambas perigosas, demoradas e de alto custo. Além disso, geram grandes volumes de sólidos contaminados por petróleo que devem ser descartados em local adequado. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a redução da viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do petróleo após a quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual devido à ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemáticos (BOGNOLO, 1999).

- **Recuperação terciária do petróleo**

Apenas um terço do petróleo presente no poço pode ser recuperado através das produções primária e secundária. As forças capilares prendem o petróleo nos poros das rochas-mãe, impedindo sua retirada. As estratégias existentes para retirar esse óleo aprisionado, incluem a recuperação secundária a qual é realizada a partir de processos térmicos ou químicos, e a recuperação terciária, que envolve a utilização de microrganismos. As aplicações microbianas representam o mais recente progresso, já que os microrganismos produzem uma variedade de compostos úteis para a recuperação de petróleo, tal como biossurfactantes, polímeros e gases, que podem ser produzidos por microrganismos aeróbios em fermentadores convencionais, usando matéria prima de baixo valor, visando substituir os surfactantes químicos que são derivados do próprio petróleo e possuem alto preço. Estes produtos químicos são eficazes apenas em uma estreita faixa de temperatura e força iônica, ao contrário dos biossurfactantes, que apresentam uma enorme vantagem por manterem estáveis suas propriedades surfactantes em altas temperaturas e salinidade. Há sugestões de que microrganismos anaeróbios possam ser injetados conjuntamente ou na ausência de nutrientes em poços para produção *in situ* de biossurfactantes, entretanto, apenas pouquíssimos microrganismos anaeróbios produzem compostos com propriedades tensoativas (BOGNOLO, 1999).

Sabe-se que a geração de gás e a redução da tensão superficial induzida pelos biossurfactantes permitem significativa recuperação de petróleo a custos economicamente viáveis, porém, em geral há pouquíssimos dados a respeito, não permitindo uma interpretação precisa dos resultados (BOGNOLO, 1999).

- **Outras aplicações**

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem produtos de higiene e cosméticos, mineração, agricultura e as indústrias de papel, têxtil, cerâmica, alimentos e farmacêutica (Tabela 2).

Tabela 2: Funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Demulsificantes	Tratamento de resíduos e recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos

Fonte: Banat et al., 2000.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Microrganismo e fontes de carbono**

O microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* LBI utilizado nos ensaios realizados foi isolado e identificado no Laboratório de Bioquímica Industrial, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara (BENINCASA et al., 2002) a partir de solo contaminado com derivados de petróleo.

Os hidrocarbonetos avaliados foram: benzeno (Baker), tolueno (Reagen), querosene (marca comercial Jacaré), óleo diesel (marca comercial BR), petróleo e borra oleosa provenientes da REPLAN-PETROBRAS.

### **4.2 Meio de manutenção**

A cepa *P. aeruginosa* LBI utilizada nas fermentações foi mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tubos criogênicos contendo glicerol a 10% (v/v) e caldo nutriente composto de extrato de carne e peptona.

### **4.3 Preparo do microrganismo para os ensaios**

A partir dos tubos criogênicos de estoque, o microrganismo foi estriado em placas de Petri contendo ágar nutriente e incubado durante 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Para recuperação das células, a placa foi lavada com água destilada estéril. Realizaram-se leituras de absorbância a  $\lambda = 610 \text{ nm}$  (Espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC) do

caldo assim obtido, e diluições foram feitas para padronização da densidade óptica (D.O.) =  $0,65 \pm 0,01$ .

#### **4.4 Avaliação do potencial de degradação de hidrocarbonetos**

A avaliação da capacidade da cepa *P. aeruginosa* LBI em degradar hidrocarbonetos foi realizada em ensaio preliminar, utilizando-se o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (HANSON *et al.*, 1993). Modificou-se a metodologia original, a qual utilizava placas multipoços e cultivo estático. O estudo foi realizado em tubos de ensaio contendo 7,5 mL de meio de cultivo BH contendo 7,5 µg/mL do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol, 50 µL de hidrocarbonetos e 125 µL de inóculo padronizado em  $D.O_{610} = 0,65$ . Para benzeno e tolueno utilizou-se 50 ppm devido à toxicidade destes compostos. Os tubos de ensaio foram mantidos a 30°C e 200 rpm e observados com frequência até o desaparecimento da coloração azul.

#### **4.5 Meio e condições de cultivo para produção de biossurfactantes**

Utilizou-se como meio líquido para avaliação da produção de biossurfactantes, o meio mineral descrito por Robert *et al.*, 1989, composto por (g/L): NaNO<sub>3</sub>: 4,0; KCl: 0,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0; CaCl<sub>2</sub>: 0,01; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O:0,5; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; extrato de levedura: 0,1; e 0,05 mL/L da seguinte solução de elementos traços: boro (0,026%), cobre (0,05%), manganês (0,05%), molibdênio (0,006%) e zinco (0,07%). Como fontes de carbono utilizaram-se isoladamente derivados de hidrocarbonetos (benzeno, tolueno, querosene e óleo diesel) e petróleo bruto simulando contaminação de águas por estes. Em estudos posteriores, utilizou-se a borra oleosa proveniente do fundo de tanques de estocagem, da REPLAN–PETROBRAS, visando sua biodegradação e produção de biossurfactantes a partir de matéria prima de baixo custo.

Após ajuste de pH para 6,8 com NaOH ou HCl 1N, quando necessário, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 20 minutos, sem a fonte de carbono para os casos de benzeno, tolueno, querosene e óleo diesel, sendo estes acrescentados ao meio de cultivo após esterilizados através de membrana filtrante 0,25 µm.

Quando se utilizou benzeno e tolueno, foram aplicadas baixas concentrações destes compostos, variando entre 10 a 500 ppm. Nos ensaios com querosene e óleo

diesel, utilizou-se 0,4; 1,0; 2,0; 5,0; 10; 20 e 30% destes compostos. Nos ensaios empregando petróleo bruto e resíduo oleoso, as concentrações foram de 2; 5 e 10%. Todos os experimentos foram incubados em mesa agitadora, a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$  e 200 rpm.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL, contendo um volume final de 100 mL de meio de cultivo. Os frascos foram inoculados com 5% da suspensão celular de *P. aeruginosa* padronizada, obtida do cultivo em placas de ágar nutriente e mantidos durante 168 horas a 200 rpm e  $30^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise de crescimento celular e produção de ramnose. As medidas de tensão superficial e pH foram realizadas no meio de cultivo inicial (tempo zero) e ao final de cada ensaio (após 168 horas).

#### **4.6 Determinação do crescimento celular**

O crescimento microbiano, no primeiro momento, foi realizado mediante contagem de células viáveis (UFC/mL), onde 1 mL do caldo de cultivo foi retirado e diluído com água destilada estéril em dez concentrações diferentes (1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>... 1:10<sup>10</sup>). Foram realizados plaqueamentos utilizando-se microgotas de 20 µL de cada diluição em triplicatas, seguindo-se de incubação em estufa bacteriológica a  $30^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 20 horas. A contagem foi realizada na diluição onde se observava um número de colônias entre 5 e 35, estando bem visíveis e individuais. Realizaram-se os cálculos para que a unidade de expressão fosse UFC/mL.

A partir dos ensaios com as concentrações 10, 20 e 30%, optou-se pelo método de análise de proteína realizado a partir de uma alíquota retirada diretamente do caldo de cultivo, em substituição a contagem de unidades formadoras de colônias. A quantificação de proteína celular é mais rápida e prática.

Para determinar a proteína celular das amostras foi utilizado o método de Hartree-Lowry (1972), como descrito a seguir.

##### Solução A:

- 2 g de tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado (7 mM final)
- 100 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,8 M final)
- 500 mL NaOH 1N (0,5 M final)
- completar até 1 L com água destilada

\*a solução pode ser estocada por 2 a 3 meses em temperatura ambiente em frasco plástico.

Solução B:

- 2 g de tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado (0,07 M final)
- 1 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,04 M final)
- 90 mL de água destilada
- 10 mL de NaOH 1N

\*a solução pode ser estocada por 2 a 3 meses em temperatura ambiente em frasco plástico.

Solução C:

Diluir 1 mL de Folim-Ciocalteu em 15 mL de água destilada.

Procedimento:

Em tubo de ensaio:

- Adicionar 1 mL da amostra contendo a proteína;
- Adicionar 0,9 mL da solução A;
- Incubar por 10 min a 50°C;
- Esfriar em temperatura ambiente;
- Adicionar 0,1 mL da solução B;
- Incubar por 10 min em temperatura ambiente;
- Adicionar 3 mL da solução C;
- Incubar por 10 min a 50°C;
- Esfriar em temperatura ambiente;
- Realizar leitura de absorbância a  $\lambda = 650 \text{ nm}$ .

Primeiramente foi preparada uma curva padrão de soroalbumina bovina, a partir de uma solução estoque de 300 mg/L. Esta solução foi diluída em 6 tubos diferentes, com concentrações de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mg/L. Aplicou-se o procedimento citado acima para cada uma das diluições e foi realizada a leitura de absorbância ( $\lambda = 650 \text{ nm}$ )

das mesmas. A Figura 4 apresenta a curva padrão de soroalbumina, a partir da qual se obteve a expressão:

$$[\ ] \text{ de proteína} = [(\text{Valor da absorbância} \times 0,34141) - 0,00375] \times \text{Fator de diluição}$$

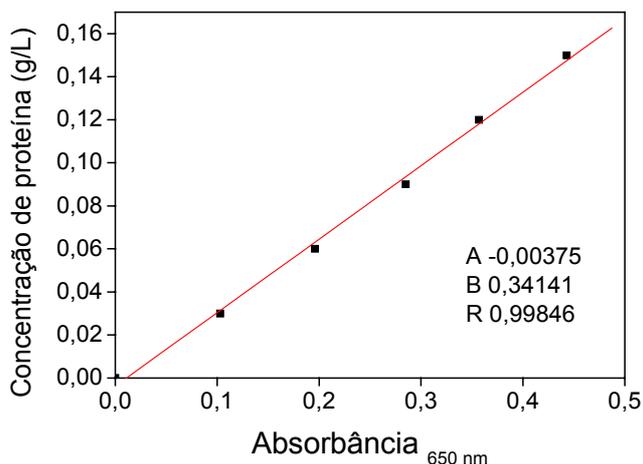


Figura 4- Curva padrão de concentração de soroalbumina bovina x absorbância.

Para a determinação de proteína celular de cada amostra, o mesmo procedimento citado anteriormente foi seguido e a equação acima foi utilizada para a conversão dos dados de absorbância à concentração equivalente.

#### 4.7 Determinação da concentração de ramnose

A produção do ramnolípido foi quantificada colorimetricamente em termos de concentração de ramnose produzida no meio de cultivo, através da análise de 6-deoxihexose (CHANDRASEKARAM e BEMILLER, 1980).

Preparo dos reagentes:

##### Solução A:

- 90 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 15 mL de água destilada

\* pode ser preparada anteriormente e estocada em frasco âmbar.

##### Solução B:

- 0,2 mL de ácido tioglicólico

- 5,8 mL de água destilada
- \* deve ser preparada apenas no momento de uso.

Procedimento:

Em tubo de ensaio:

- Adicionar 1 mL de amostra contendo ramnose;
- Adicionar 4,5 mL da solução A;
- Incubar por 10 min a 100°C;
- Resfriar a temperatura ambiente;
- Adicionar 0,1 mL da solução B;
- Homogeneizar os tubos
- Guardar em local com ausência de luz por 3 horas;
- Realizar leitura de absorvância a  $\lambda = 400 \text{ nm}$  e  $\lambda = 430 \text{ nm}$ .

Primeiramente foi preparada uma curva padrão de ramnose, a partir de uma solução inicial de ramnose comercial 50 mg/L. Esta solução foi diluída em concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,5; 8,8 e 1,0 mg/L. Aplicou-se o procedimento citado acima para cada uma das diluições e foi realizada a leitura de absorvância ( $\lambda = 400\text{nm}$  e  $\lambda = 430\text{nm}$ ) das mesmas. A leitura realizada em  $\lambda = 430\text{nm}$  indica interferência de outros açúcares. Subtraiu-se o valor de D.O. obtido na leitura a  $\lambda = 430\text{nm}$ , daquele obtido na leitura a  $\lambda = 400\text{nm}$ , para se obter o valor de absorvância final. A Figura 5 apresenta a curva padrão de ramnose, a partir da qual se obteve a seguinte expressão:

$$[\ ] \text{ de ramnose} = \left[ \frac{\text{Absorvância final} - 0,00692}{0,00885} \right] \times \text{fator de diluição}$$

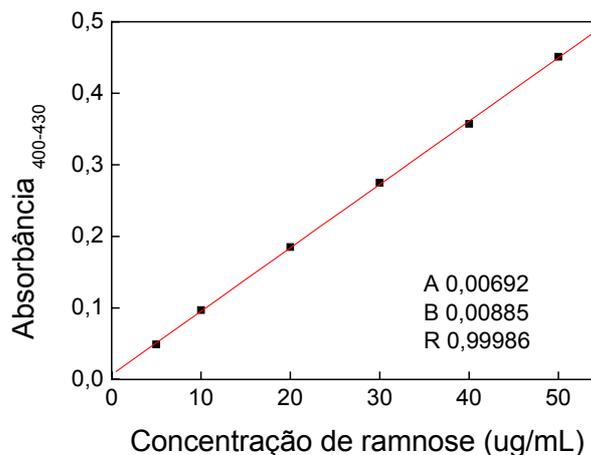


Figura 5- Curva padrão de concentração de ramnose x absorvância.

Para a determinação da concentração de ramnose das amostras retiradas a cada 24 horas, 2 mL de cada amostra foram centrifugados por 10 minutos a 10000 rpm, separou-se o sobrenadante e a partir deste realizou-se o mesmo procedimento citado anteriormente. A equação acima foi utilizada para a conversão dos dados de absorvância à concentração equivalente.

#### 4.8 Determinação da tensão superficial e pH

A determinação de produção de biossurfactante foi realizada medindo-se as tensões iniciais e finais do caldo de cultivo livre de células, utilizando-se o tensiômetro Krüss K 6, segundo o método do anel de De Nöuy. O pH foi analisado utilizando-se um pHmetro Digimed.

#### 4.9 Determinação do Índice de Emulsificação (E24)

Neste estudo avaliou-se a estabilidade de emulsões formadas pelo biossurfactante contra diferentes fontes hidrofóbicas. As análises foram realizadas em temperatura ambiente. O Índice de emulsificação foi determinado, segundo IQBAL et al., 1995, através da adição do hidrocarboneto a ser avaliado ao caldo de cultivo livre de células (2mL de cada), em tubos de ensaio seguidos por agitação em alta velocidade em vórtex durante 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado através da fórmula:

$$E24 = (\text{altura da camada de emulsão/altura total}) \times 100$$

#### **4.10 Avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido**

Os estudos de estabilidade foram realizados usando o caldo livre de células do ensaio realizado com 30% de óleo diesel, após 168 horas de incubação. O efeito da temperatura foi avaliado aquecendo-se amostras em banho-maria (100<sup>0</sup>C) por diferentes intervalos de tempo e resfriados a temperatura ambiente. A estabilidade ao pH foi analisada ajustando-se o caldo a diferentes valores de pH. Para estudar o efeito da adição de sal sobre o biossurfactante, acrescentou-se ao caldo 3,5% de NaCl, valor correspondente a salinidade marinha, e misturou-se até completa dissolução. Para análise sob pressão, colocou-se o caldo em autoclave, durante 15 minutos a 121<sup>0</sup>C e 1 atm. Analisaram-se possíveis alterações na tensão superficial para cada tratamento.

#### **4.11 Análise dos elementos inorgânicos da borra oleosa**

A análise dos elementos inorgânicos da borra oleosa foi realizada no Instituto Campineiro de Análises de Solo e Adubo (ICASA), Campinas, SP.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio preliminar em tubos de ensaios

Utilizou-se o indicador redox-2,6-diclorofenol indofenol em meio de cultivo BH para detecção do potencial bacteriano em degradar hidrocarbonetos (HANSON et al., 1993) nas condições descritas anteriormente. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI apresentou resultados positivos, obtidos a partir de observação visual da descoloração do meio, para óleo diesel e petróleo após 23h, querosene após 68h e descoloração parcial para borra oleosa após 72h (Figura 6).

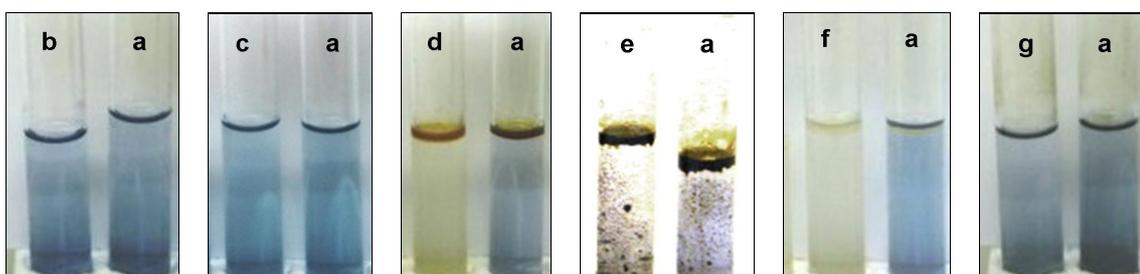


Figura 6- Ensaio com o indicador redox- 2,6 diclorofenol indofenol. a-) Controles b-) Benzeno c-) Tolueno d-) Óleo diesel e-) Petróleo f-) Querosene g-) Borra oleosa.

Os resultados para óleo diesel, querosene, petróleo e borra oleosa indicaram que o microrganismo foi capaz de degradar estas fontes de carbono, e que possivelmente consigam produzir biossurfactantes nestas condições. Entretanto, nos meios de cultivo contendo benzeno e tolueno, mesmo após 7 dias de observação, não houve alteração na coloração dos meios, indicando que não ocorreu oxidação destes compostos pelo microrganismo. Os resultados obtidos por esta técnica simples e rápida foram comprovados posteriormente em escala maior, onde se avaliou o crescimento celular e a produção de biossurfactantes, utilizando-se 100 mL de meio de cultivo em frascos de 250 mL, mantidos nas mesmas condições de temperatura e agitação do ensaio preliminar.

## **5.2 Influência da fonte de carbono sobre o crescimento celular e produção de biossurfactantes nos ensaios em mesa agitadora**

Os hidrocarbonetos incluem compostos formados por carbono e hidrogênio com propriedades químicas e físicas definidas pelo número de átomos e arranjo das moléculas (BALBA et al., 1998). Muitos microrganismos possuem a capacidade enzimática para degradar hidrocarbonetos do petróleo. Alguns microrganismos degradam alcanos (normal, ramificado, cíclico), outros aromáticos, e ainda outros degradam tanto hidrocarbonetos aromáticos quanto alcanos. Frequentemente, os n-alcanos com número de carbonos variando entre C<sub>10</sub> a C<sub>26</sub> são prontamente degradados, assim como os compostos tóxicos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno. A biodegradação de petróleo no ambiente marinho é realizada por uma grande diversidade de populações bacterianas, incluindo várias espécies de *Pseudomonas* (ATLAS, 1995). A seguir estão os resultados obtidos nos ensaios com benzeno, tolueno, querosene, óleo diesel, petróleo e borra oleosa.

### **5.2.1 Ensaio com benzeno e tolueno**

Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos conhecidos coletivamente como BTEX são os principais componentes aromáticos em muitos derivados do petróleo, e são muitas vezes encontrados em águas subterrâneas, como resultado de vazamentos de tanques de estocagem subterrâneos e dutos (SHIM e YANG, 1999). Tanto benzeno

quanto o tolueno foram escolhidos para este estudo por serem contaminantes comuns de aquíferos.

Os ensaios com benzeno e tolueno foram realizados numa primeira etapa a 200 rpm e 30<sup>0</sup>C e numa segunda etapa optou-se por 100 rpm e 25<sup>0</sup>C, na tentativa de diminuir a evaporação destes compostos aromáticos. Iniciou-se com concentrações mínimas e sequencialmente concentrações maiores, a fim de avaliar-se o possível efeito tóxico destes compostos sobre o desenvolvimento celular. Variações entre 10 e 500 ppm não proporcionaram nenhum tipo de desenvolvimento celular. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no ensaio preliminar, onde não se observou oxidação destes compostos.

Compostos como o tolueno e o fenol encontrados no petróleo, são usados como desinfetantes. A ação dos componentes pode ser bacteriostática ou bactericida para os microrganismos, dependendo da concentração. O tolueno, por exemplo, pode estimular o crescimento de microrganismos em baixa concentração, mas mostra ação bacteriostática em alta concentração. Os produtos da oxidação dos hidrocarbonetos aromáticos podem ser mais tóxicos que os compostos originais (ROSATO, 1997). Benzeno é o hidrocarboneto mais tóxico entre os componentes do BTEX.

Segundo Rosato, 1997, compostos com um, dois ou três anéis aromáticos são degradados facilmente e há linhagens capazes de degradar compostos com até cinco anéis aromáticos. Os compostos aromáticos mais leves são sujeitos à evaporação e à degradação microbiana no estado dissolvido. Entretanto, observamos que a cepa *P. aeruginosa* LBI utilizada em nossos estudos não mostrou desenvolvimento nestas fontes de carbono.

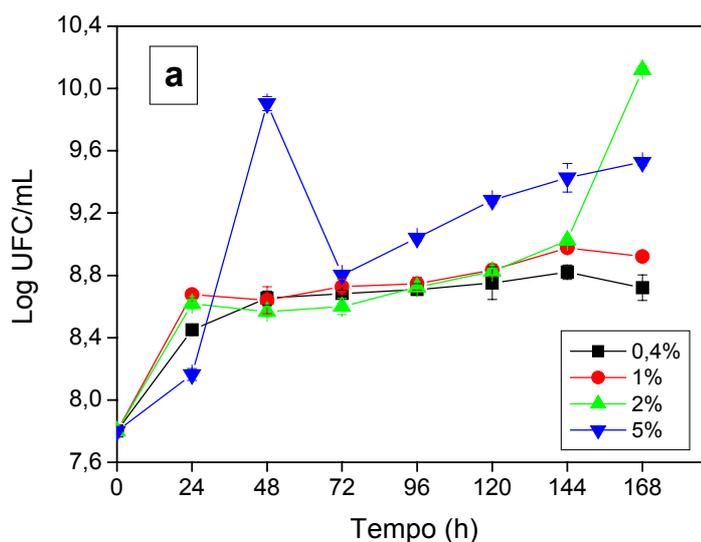
Su e Kafkewitz (1996) examinaram a degradação de benzeno, tolueno e dois isômeros de xileno (utilizados isoladamente) por *Xanthomonas maltophilia*, em frascos fechados com rolhas de borrachas, mantidos a 30<sup>0</sup>C. A agitação do meio de cultivo foi promovida por meio de agitação magnética. A cepa foi capaz de crescer em meio mineral contendo tolueno ou os isômeros de xileno como única fonte de carbono e energia, entretanto, nenhum crescimento foi observado em benzeno.

Shim e Yang (1999) estudaram a cinética de degradação de BTEX em bioreator com células imobilizadas de *P. putida* e *P. fluorescens* e células livres crescendo em frascos, a 25<sup>0</sup>C. Observaram que a taxa de biodegradação, assim como, a tolerância a

altas concentrações de benzeno e tolueno (>1000 mg/L) foi muito maior nas células imobilizadas do que nas células livres (500 mg/L), mostrando que a insensibilidade à toxicidade destes compostos foi atribuída a adaptação das células no bioreator.

### 5.2.2 Ensaios com querosene

Foram utilizadas concentrações crescentes de querosene em cada experimento visando descobrir a tolerância da cepa bacteriana a este composto e a cinética do crescimento celular. Realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) nos ensaios onde a concentração de querosene no meio de cultivo foi igual a 0,4; 1; 2; e 5% (Figura 7a). Nos ensaios onde se utilizou as concentrações de 10, 20 e 30% de querosene, optou-se por realizar a dosagem de proteína celular em substituição ao método de contagem de colônias viáveis (Figura 7b).



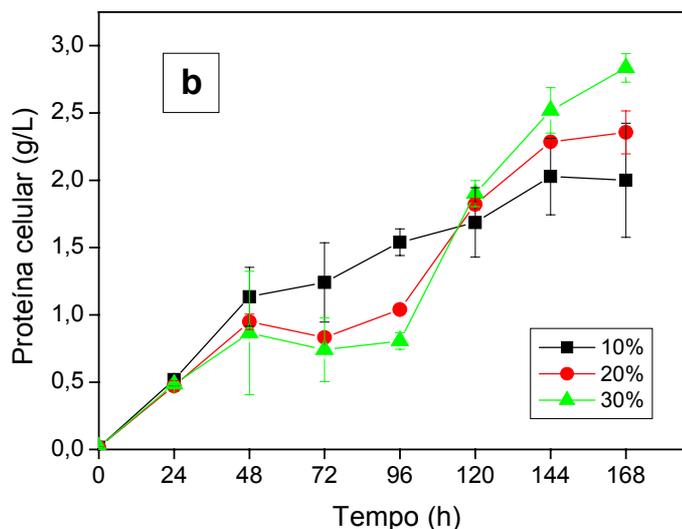


Figura 7- Efeito das concentrações de querosene sobre o crescimento celular durante cultivo a 30°C, 200 rpm, pH inicial 6,8. a-) Contagem de colônias. b-) Determinação de proteína celular.

A utilização do querosene como substrato para *P. aeruginosa* LBI é mostrado pelo aumento do número de células e proteína celular (Figuras 7a e 7b). A partir da Figura 7a, observou-se que baixas concentrações, como 0,4 e 1% de querosene proporcionaram um desenvolvimento celular máximo ( $10^8$  UFC/mL) nas primeiras 24 horas de cultivo, entrando em seguida na fase estacionária de crescimento, provavelmente devido ao consumo de grande parte da fonte de carbono neste primeiro momento. O aumento na concentração de querosene para 2% também apresentou um primeiro pico de crescimento nas 24 horas iniciais, seguido por um segundo pico no final das 144 horas de cultivo. Pode-se inferir que este segundo pico de crescimento tenha ocorrido pelo consumo do próprio ramnolipídeo, que anteriormente foi produzido para emulsificar o querosene. Quando se utilizou 5% da fonte de carbono, observou-se uma fase Lag de adaptação nas primeiras horas, seguida pela fase logarítmica de crescimento que atingiu o seu máximo em 48 horas ( $10^9$  UFC/mL), posteriormente entrando em declínio.

Optou-se pelo método de quantificação de proteína celular nos ensaios com concentrações mais altas, como 10, 20 e 30% de querosene (Figura 7b), pelo fato de ser uma metodologia rápida e simples para detecção de crescimento celular através da produção de proteínas celulares. Utilizando-se um inóculo contendo 0,02 g/L de

proteína celular, não se observou nenhum tipo de inibição do crescimento celular nestas concentrações de querosene, mostrando que a cepa *P. aeruginosa* LBI é completamente apta a degradar querosene mesmo em altas concentrações. O ensaio contendo 30% de querosene foi o que mais favoreceu o desenvolvimento celular, produzindo 2,83 g/L de proteína celular ao final de 168 horas de incubação. Os caldos de cultivos tornaram-se turvos evidenciando a formação de biomassa (Figura 8).

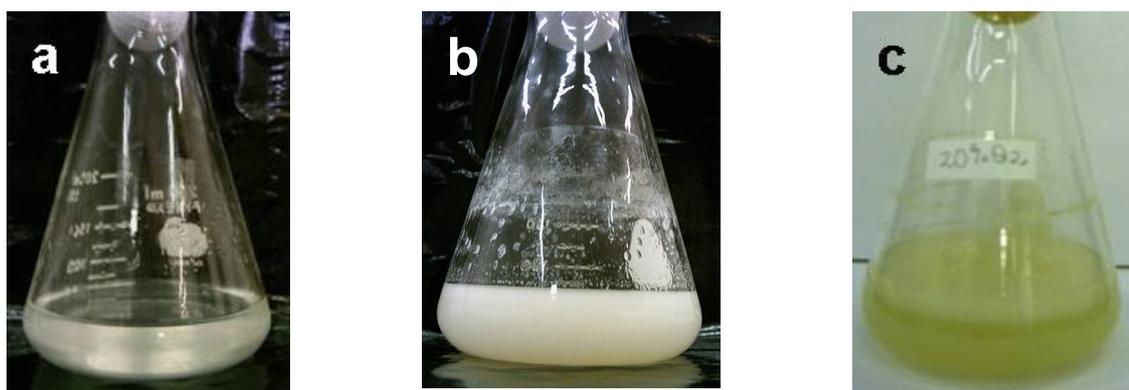


Figura 8- Meios de cultivos com querosene: a-) controle; b-) meio de cultivo com 5% de querosene inoculado com *P. aeruginosa* LBI (168h de incubação); c-) meio de cultivo com 20% de querosene inoculado com *P. aeruginosa* LBI (168h de incubação).

Barathi e Vasudevan (2001) utilizando  $10^4$  UFC/mL de *P. fluorescens* em meio salino contendo 0,4% de hidrocarbonetos, observaram que esta espécie de bactéria utiliza preferencialmente hexadecano como principal fonte de carbono, seguido por hexano, decano, querosene e óleo cru. No cultivo com querosene, a fase de crescimento ocorreu nas primeiras 24 horas e nenhum dado sobre produção de biossurfactante foi relatado. Entretanto, no cultivo com hexadecano, observaram redução da tensão superficial do meio de 60 para 35 mN/m nas primeiras 24 horas. Análises de cromatografia gasosa revelaram a utilização de 95% deste composto pelo microrganismo em 48 horas.

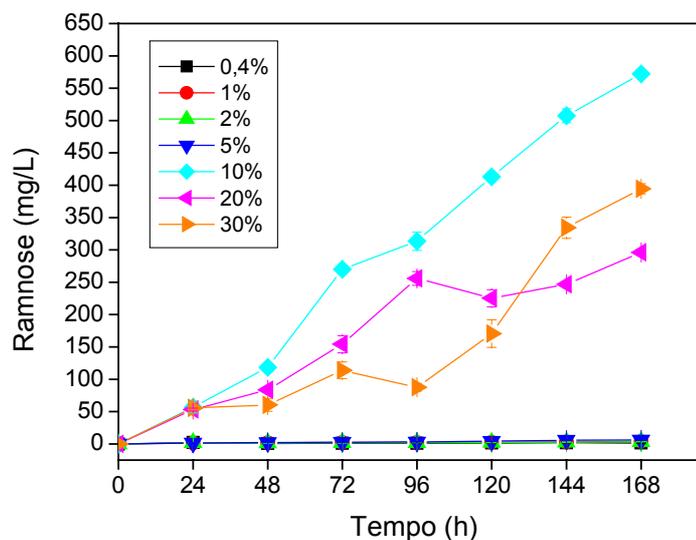


Figura 9- Produção de biossurfactantes em termos de ramnose durante cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de querosene.

Analisando a produção de biossurfactantes durante o crescimento em querosene, nas diversas concentrações utilizadas, observa-se que em condições de baixa concentração da fonte de carbono, uma quantidade mínima (entre 2 e 6,4 mg/L) de biossurfactante, medido em termo de ramnose, é produzida (Figura 9). A agitação de 200 rpm favoreceu a formação de pequenas gotas de querosene, que facilitaram o contato entre as células e pouco biossurfactante foi necessário para promover a degradação.

Estudos mostram que uma baixa concentração de biossurfactantes é suficiente para reduzir ao máximo as tensões superficial (água/ar) e interfacial (água/óleo). Zhang e Miller, 1992, apud Benincasa et al., 2004, relatam que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a CMC está tipicamente entre 1 a 200 mg/L, fato que foi observado em nossos experimentos.

Quando se utilizou 10, 20 e 30% de querosene, uma camada espessa de hidrocarboneto se formou na superfície do meio de cultivo. A agitação de 200 rpm pouco alterou a área de contato entre a interface de hidrocarboneto e bactérias. Após algumas horas de incubação, já era possível notar a formação de gotas menores de querosene, devido à produção de biossurfactantes no meio de cultivo, e a formação de um biofilme fino de bactérias entre a interface querosene/meio de cultivo. A *P. aeruginosa* LBI foi capaz de emulsificar totalmente apenas até o experimento realizado

com 10% de querosene. Neste experimento, observa-se pela Figura 9 que a quantidade de biossurfactante medido como ramnose, destaca-se dos experimentos com 20 e 30% a partir das 48 horas, e a produção de biossurfactantes manteve-se crescente até completar 168 horas. Nos experimentos com 20 e 30%, a fase superior contendo uma porção de querosene residual e emulsão, manteve-se isolada do restante do meio de cultivo até o final das 168 horas. A divisão entre as duas fases pode ter interferido na quantificação do biossurfactante, já que este se acumula nas espumas e emulsões formadas. Mais dias de incubação seriam necessários para que todo hidrocarboneto disponível fosse consumido.

A correlação entre produção de biossurfactantes e crescimento celular sobre substratos insolúveis em água foi realmente mostrada por Itoh e Suzuki (1972). Eles demonstraram o efeito estimulante dos ramnolipídeos no crescimento da linhagem mutante de *P. aeruginosa* PU-1 deficiente na utilização de n-parafinas.

Na fase logarítmica de crescimento, a observação de pequenas quantidades de biossurfactantes acima da CMC pode ser atribuída à extração destes compostos da parede celular pelo hidrocarboneto (HOMMEL e RATLEDGE, 1993).

Visando confirmar a produção de biossurfactantes nos meios de cultivo, foram feitas medidas da tensão superficial no meio de cultivo sem inóculo e após 168 horas de incubação com *P. aeruginosa* LBI. A partir da análise da Figura 10 e da Tabela 3, observa-se que nos meios de cultivo onde houve a produção mínima de biossurfactantes, a tensão superficial também apresentou pequena variação, ficando em torno de 50-40 mN/m, e promovendo uma redução na tensão superficial em torno de 17,7 a 26,4%, confirmando os dados obtidos com a análise de produção de ramnose. Variações mais notáveis são observadas a partir do experimento com 5% de querosene, onde os valores de tensão superficial estão próximos a 35 mN/m, e a porcentagem de redução foi de 38,8%. A maior porcentagem de redução da tensão superficial observou-se no cultivo com 20% de querosene como fonte de carbono.

Haba et al., 2000, consideram bons produtores de biossurfactantes aqueles microrganismos que reduzem a atividade superficial a 40 mN/m ou menos.

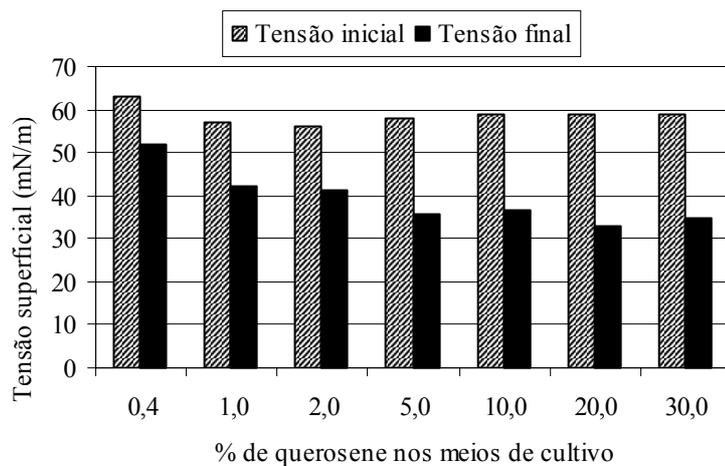


Figura 10- Variações da tensão superficial inicial e final durante os ensaios a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de querosene.

Tabela 3- Porcentagem de redução da tensão superficial nos experimentos com querosene.

Concentração de querosene no cultivo (%)	% de redução da tensão superficial
0,4	17,7
1,0	26,3
2,0	26,4
5,0	38,8
10,0	38,1
20,0	45
30,0	41,7

O pH dos meios de cultivos também foi monitorado e este se apresentou ligeiramente alcalino em todos os experimentos, atingindo o valor máximo no ensaio com 10% de querosene, onde se obteve também a maior quantificação de ramnose (Figura 11). Valores de pH para meio neutro a ligeiramente alcalinos favorecem o crescimento celular de bactérias. Esse aumento no pH pode ter ocorrido devido à autólise celular.

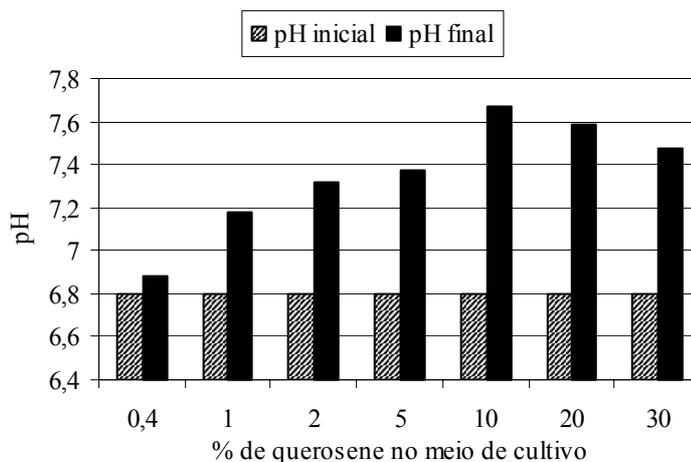


Figura 11- Variações de pH durante cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de querosene.

### 5.2.3 Ensaio com óleo diesel

Os ensaios com óleo diesel foram realizados nas mesmas concentrações do experimento anterior.

A utilização do óleo diesel como substrato para *P. aeruginosa* LBI é mostrada pelo aumento de biomassa durante os experimentos. Em todas as concentrações avaliadas, observou-se que o aumento na quantidade de carbono no meio de cultivo favoreceu o crescimento celular, demonstrando a capacidade deste microrganismo em degradar este hidrocarboneto (Figuras 12a e 12b).

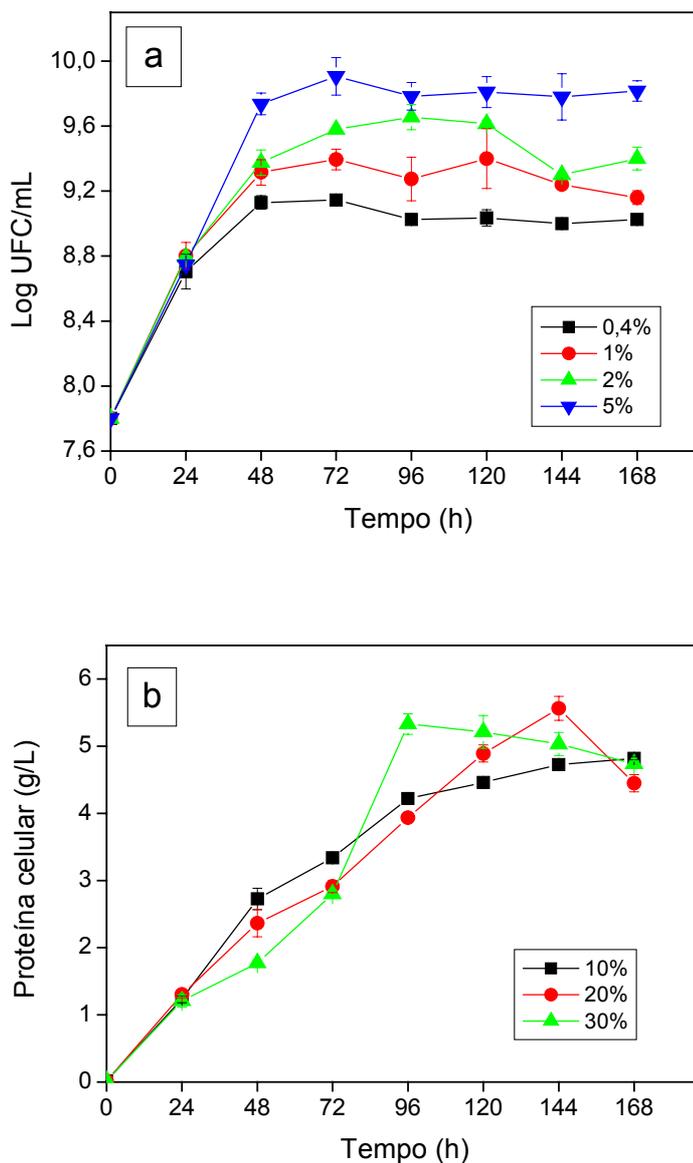


Figura 12- Efeito das concentrações de óleo diesel sobre o crescimento celular durante o cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8. a-) Contagem de colônias b-) Determinação de proteína celular.

Nos ensaios onde se utilizou concentrações de óleo diesel a 0,4; 1; 2 e 5%, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias para avaliar o crescimento celular. Observou-se que este atingiu o seu máximo nas primeiras 48 horas, entrando em seguida na fase estacionário de crescimento (Figura 12a). Provavelmente o microrganismo tenha utilizado grande parte da fonte de carbono nestas 48 horas iniciais.

Em concentrações maiores de óleo diesel, realizou-se a dosagem de proteína no caldo de cultivo em substituição ao método de contagem de colônias. O aumento da

concentração desta fonte de carbono até o valor 30% não prejudicou o desenvolvimento celular (Figura 12b).

A formação de biomassa durante os experimentos foi visivelmente percebida através das mudanças de coloração e turvação dos meios de cultivo (Figura 13).

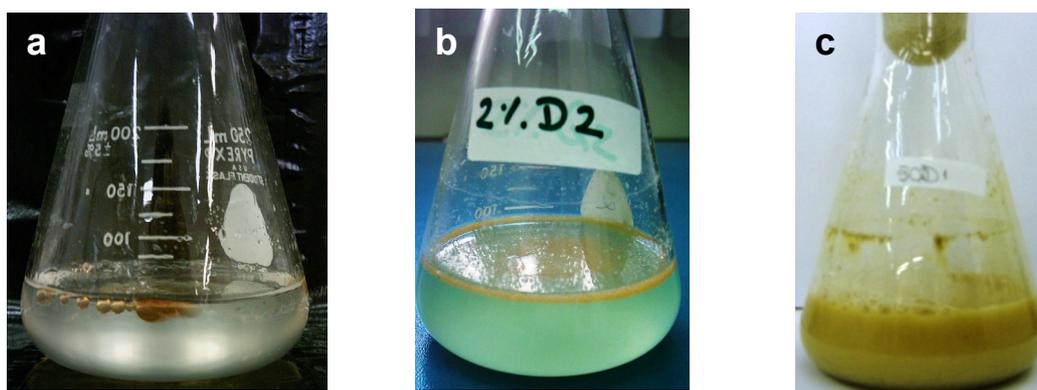


Figura 13- Meios de cultivos contendo óleo diesel: a-) controle; b-) meio de cultivo contendo 2% de óleo diesel e inóculo de *P. aeruginosa* LBI (após 168 h de incubação); c-) meio de cultivo contendo 30% de óleo diesel e inóculo de *P. aeruginosa* LBI (após 168 h de incubação).

A produção de biossurfactantes foi avaliada através da quantidade de ramnose excretada no meio de cultivo (Figura 14).

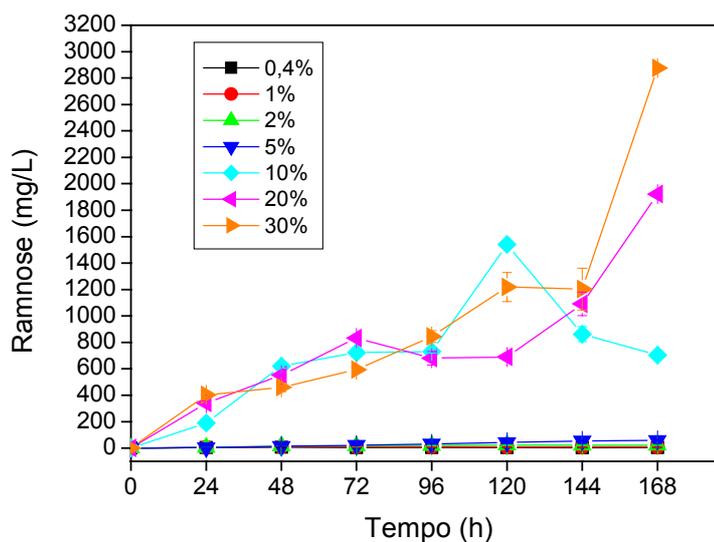


Figura 14- Produção de biossurfactante em termos de ramnose durante cultivo a 30°C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de óleo diesel.

Nos experimentos com 0,4 – 5% de óleo diesel, pouca quantidade de biossurfactante (em termos de ramnose) foi detectada. A agitação de 200 rpm favoreceu a dispersão do hidrocarboneto em gotas menores, facilitando assim, o acesso dos microrganismos a esta fonte de carbono. Acredita-se que um excesso de fonte de carbono estimule a produção de biossurfactantes na fase estacionária de crescimento, onde o microrganismo altera seu metabolismo anteriormente voltado para a produção de biomassa (proteína) e passa a sintetizar moléculas tensoativas. A maior produção de biossurfactantes medida pela produção de ramnose (2,9 g/L) em óleo diesel foi observada no cultivo com 30% desta fonte de carbono, após 168h de incubação.

Lang e Wagner, 1993, relataram que alterações das condições nutricionais, de temperatura e pH inibem o crescimento celular e então, as enzimas para a síntese de biossurfactantes são acionadas. A produção destas moléculas acontece até quando as fontes de carbono e oxigênio forem suficientes e a energia celular permitir.

Observaram-se mudanças significativas da tensão superficial a partir do aumento da concentração de óleo diesel no meio de cultivo, indicando que nestas condições mais biotensoativos foram produzidos (Figura 15 e Tabela 4). O valor mais baixo de tensão superficial foi obtido no experimento com 30%, aonde a tensão superficial chegou a 33,0 mN/m e a porcentagem de redução foi de 36,5%.

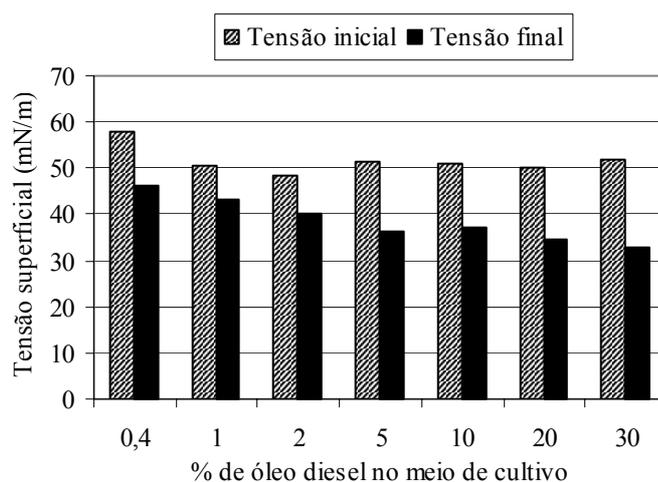


Figura 15- Variações da tensão superficial inicial e final durante cultivo a 30°C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de óleo diesel.

Tabela 4- Porcentagem de redução da tensão superficial nos experimentos com óleo diesel.

Concentração de óleo diesel no cultivo (%)	% de redução da tensão superficial
0,4	20,2
1,0	14,3
2,0	17,0
5,0	31,1
10,0	27,4
20,0	31
30,0	36,5

Avaliações dos valores de pH ao final de cada experimento revelaram que este se tornou levemente alcalino em todos os ensaios, provavelmente devido à autólise celular (Figura 16).

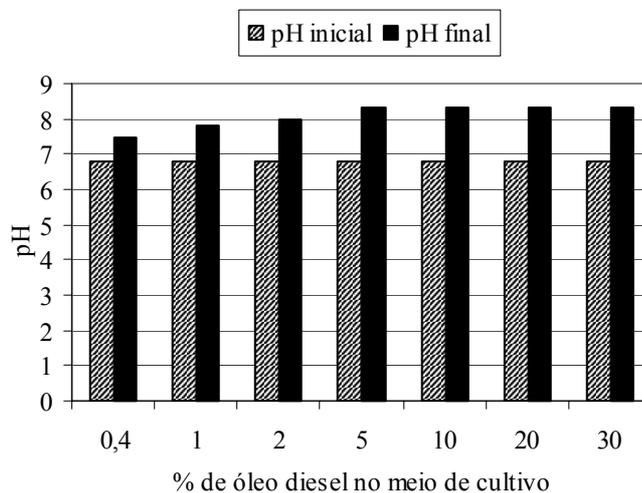


Figura 16- Variações de pH durante cultivo a 30°C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de óleo diesel.

### 5.2.4 Ensaios com petróleo

Os resultados dos ensaios avaliando-se o crescimento celular e a produção de biossurfactante em petróleo proveniente da REPLAN-PETROBRAS estão expressos nas Figuras 17 e 18.

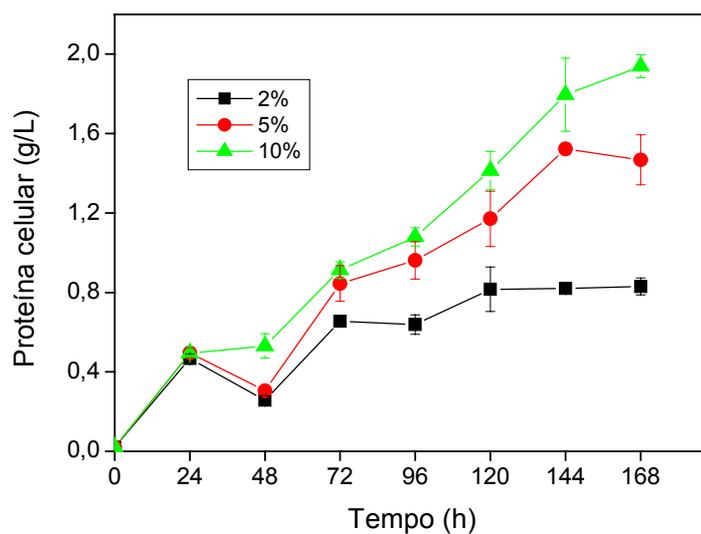


Figura 17- Efeito da concentração do petróleo sobre o crescimento celular durante cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8.

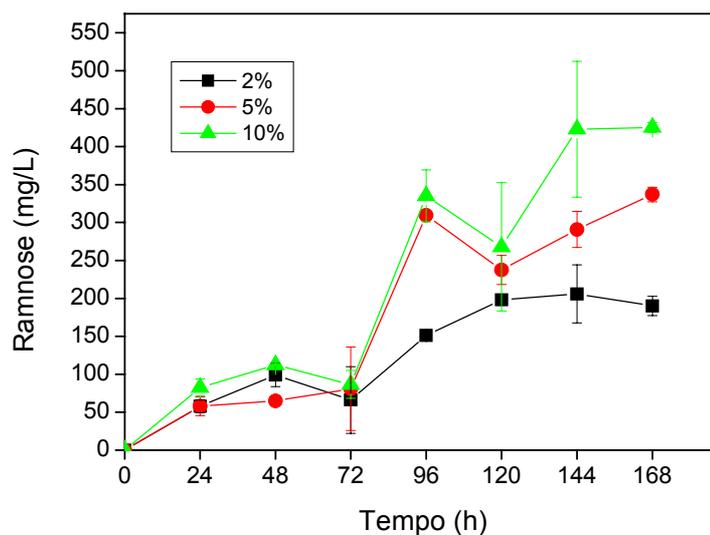


Figura 18- Produção de biossurfactantes em termos de ramnose durante cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de petróleo.

Utilizando-se 2% de petróleo, o desenvolvimento celular atingiu a fase estacionária após 72 horas de incubação (Figura 17). A partir deste momento, observou-se a crescente produção de biossurfactantes (Figura 18). Altas concentrações de petróleo (5 e 10%) não inibiram o crescimento celular. No cultivo com 10% de petróleo, obteve-se 2 g/L de proteína celular e a produção de biossurfactantes quantificada em termos de ramnose foi 0,4 g/L após 168 horas.

A produção de biossurfactantes no meio de cultivo promoveu a redução da tensão superficial em todos os experimentos, como apresentam a Figura 19 e a Tabela 5.

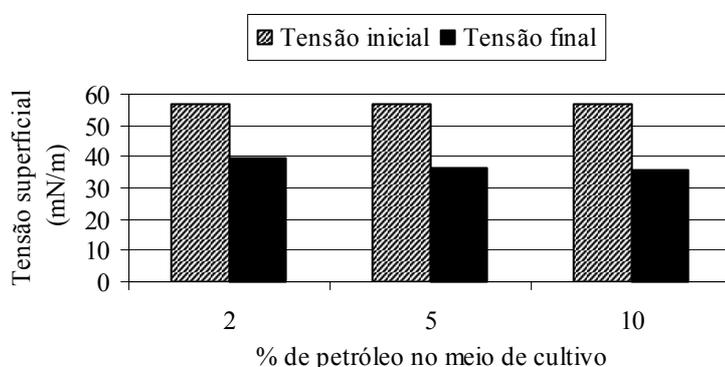


Figura 19- Variações na tensão superficial inicial e final durante cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de petróleo.

Tabela 5- Porcentagem de redução da tensão superficial nos experimentos com petróleo.

Concentração de petróleo no cultivo (%)	% de redução da tensão superficial
2,0	30,7
5,0	36,0
10,0	37,7

Zhang et al., 2005, verificaram a habilidade de uma cepa de *P. aeruginosa* em produzir biossurfactantes em cultivo com 3% de glicerol e obtiveram 15,4 g/L de ramnolipídeos. Entretanto, quando realizaram experimentos com essa linhagem em meio contendo petróleo como única fonte de carbono, nenhum crescimento e nem produção de biossurfactantes foram observados após 10 dias de incubação. Esta

linhagem de *P. aeruginosa* necessita de uma fonte de carbono adicional ou inoculação de ramnolipídeos juntamente com o petróleo para que consiga promover a biodegradação deste.

Avaliações dos valores de pH ao final de cada experimento revelaram que este se tornou levemente alcalino, assim como ocorreu nos ensaios anteriores com querosene e óleo diesel (Figura 20).

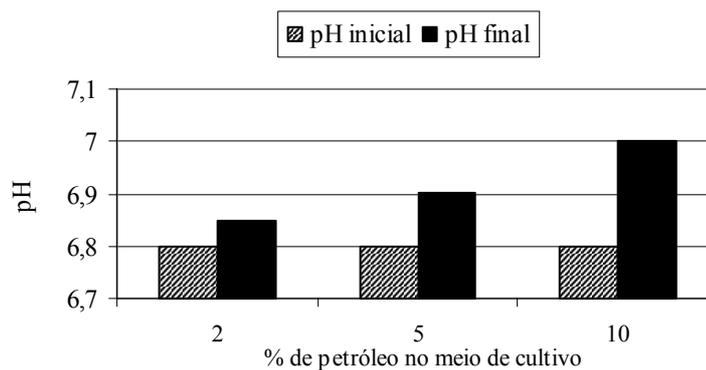


Figura 20- Variações de pH durante cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de petróleo.

### 5.2.5 Ensaios com borra oleosa

Buscando uma fonte alternativa de baixo custo para a produção de biossurfactantes, optou-se pela utilização da borra oleosa proveniente de fundos de tanques de estocagem (REPLAN-PETROBRAS) já que a linhagem *P. aeruginosa* LBI mostrou-se hábil em degradar derivados de petróleo.

A borra oleosa proveniente dos tanques de estocagem da REPLAN-PETROBRAS apresentou 1,03 g/L de densidade, pH 7,2 e 63,85% de matéria orgânica. As Tabelas 6 e 7 apresentam os resultados obtidos pela análise dos elementos inorgânicos presentes na borra oleosa.

Tabela 6- Análise de elementos inorgânicos na borra oleosa, apresentados em porcentagem.

Elementos inorgânicos	%
N	0,53
Ca	0,29
Mg	0,11
S	0,32
Fe	0,69
Na	0,13
Al	0,71
C/N	66,93

Tabela 7- Análise de elementos inorgânicos da borra oleosa, apresentados em ppm.

Elementos inorgânicos	ppm
P total	908
Mn	138
Cu	27,5
Zn	683
B	50
Co	2,5
Ba	52,11
Cd	0,28
Cr	57,81
Ni	14,14
Pb	13,23

O resíduo oleoso em questão apresenta muitos componentes que fazem parte do Anexo C (substâncias que conferem periculosidade aos resíduos) da norma NBR 10004 – “Resíduos Sólidos: classificação” (ABNT – Associação Brasileira de Normas

Técnicas, 2004) o que o torna perigoso e portanto, classificado como Resíduo Classe 1 – Perigosos.

Os resultados obtidos em relação à produção de proteína celular nos experimentos com borra oleosa estão expressos na Figura 21.

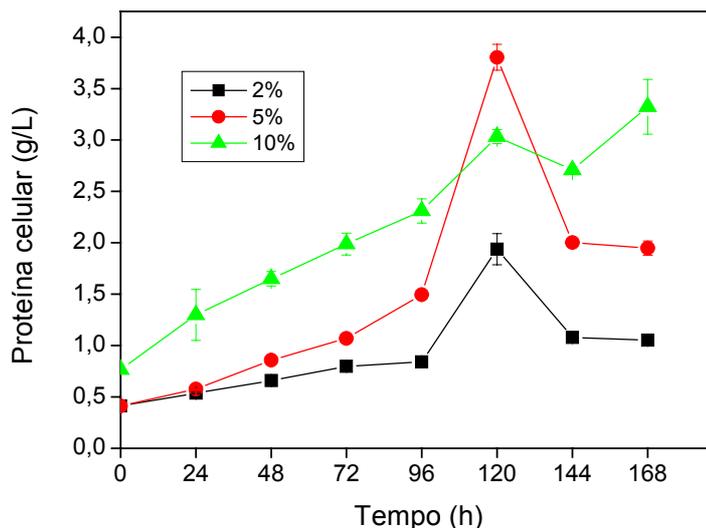


Figura 21- Crescimento celular em cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.

Observou-se um longo período de aclimação do microrganismo em todas as concentrações analisadas durante as 96 horas iniciais de incubação. Após este período, houve um crescimento notável no intervalo entre 96 e 120 horas, seguido de declínio e estabilidade do crescimento celular. Entre as concentrações analisadas, o maior crescimento celular (~4 g/L) foi obtido com 5% de borra oleosa. Quando se utilizou 10% desta fonte de carbono, ocorreu uma menor taxa de crescimento, que pode ser devido às características do resíduo, que contém concentrações de metais pesados em sua composição.

Resultados da produção de ramnose durante o cultivo em petróleo estão expressos na Figura 22.

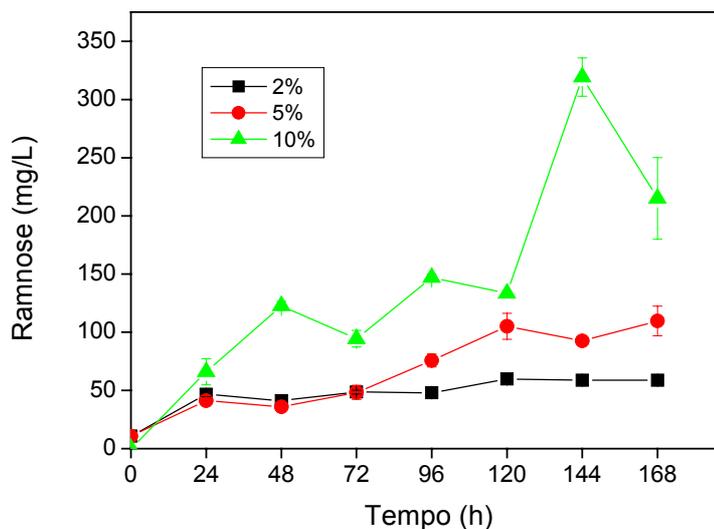


Figura 22- Produção de biossurfactantes em termos de ramnose em cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.

A produção de biossurfactantes foi maior quando a maior quantidade de resíduo esteve presente, chegando ao valor de 0,35 g/L de ramnose no meio de cultivo após 144 horas. A alta concentração do resíduo pode ter levado a condição de estresse, e com isso o microrganismo direcionou o seu metabolismo para a produção de biossurfactantes, visando conseguir uma maior biodisponibilidade da fonte de carbono. A Figura 23 apresenta as modificações da tensão superficial inicial e final durante os ensaios com borra oleosa. A Tabela 8 apresenta as reduções de tensão superficial obtidas pelas medidas de tensão superficial.

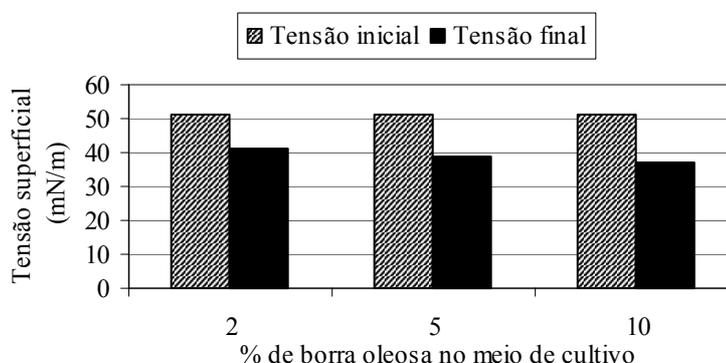


Figura 23- Variações na tensão superficial inicial e final durante o cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.

Tabela 8- Porcentagem de redução da tensão superficial nos experimentos com petróleo.

Concentração de borra oleosa no cultivo (%)	% de redução da tensão superficial
2,0	19,6
5,0	23,5
10,0	27,4

O pH final dos cultivos manteve-se levemente alcalino (Figura 24).

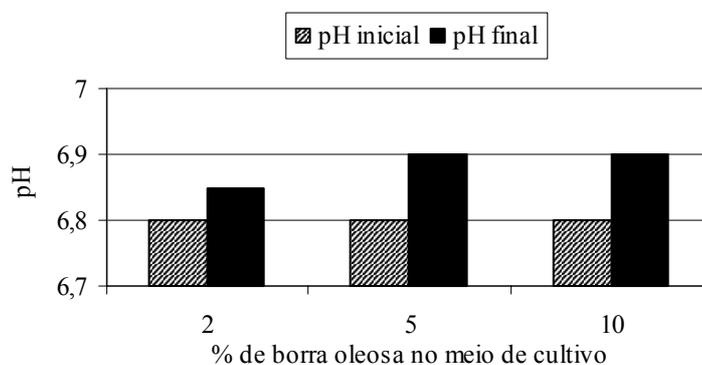


Figura 24- Variações de pH durante o cultivo a 30<sup>0</sup>C, 200 rpm, pH inicial 6,8 em diferentes concentrações de borra oleosa.

Bednarski et al., 2004, utilizaram *Candida antarctica* e *Candida apicola* em meio de cultivo suplementado com resíduo de refinaria e observaram que ocorreu produção de glicolipídeos. A maior redução da tensão superficial do caldo de cultivo em relação à tensão superficial da água (72,25 mN/m em 20,15<sup>0</sup>C) foi observada no ensaio contendo 10% de resíduo. A tensão superficial do caldo de cultivo após incubação foi de 35,7 mN/m, correspondendo a 50,5% de redução da tensão superficial. A correção do pH para 5,5 no meio de cultivo favoreceu a produção de glicolipídeos.

### 5.3 Análise comparativa entre os ensaios

Os resultados a seguir relacionam os melhores dados obtidos em relação ao crescimento celular, produção de ramnose e tensão superficial para cada fonte de hidrocarboneto.

Tabela 9- Comparação entre os valores máximos de produção de proteína celular nos diferentes ensaios.

Fonte de carbono	Proteína celular (g/L)
30% querosene	2,83
20% óleo diesel	5,56
10% petróleo	1,94
5% borra oleosa	3,8

A Tabela 9 apresenta os valores máximos de produção de proteína alcançados em cada experimento envolvendo hidrocarbonetos diferentes e em concentrações diferentes. Observa-se que o ensaio contendo 20% de óleo diesel se destaca entre os demais hidrocarbonetos estudados (5,56 g/L de proteína celular), demonstrando que nestas condições o microrganismo teve seu desenvolvimento celular favorecido. O crescimento celular mais baixo ocorreu no ensaio com petróleo (1,94 g/L).

Tabela 10- Comparação entre os valores máximos de produção de ramnose nos diferentes ensaios.

Fonte de carbono	Ramnose (mg/L)
10% querosene	572,1
30% óleo diesel	2875,4
10% petróleo	425,2
10% borra oleosa	319,3

Analisando os melhores resultados em relação à produção de biossurfactantes, observa-se que este não ocorre na mesma concentração de carbono onde maior crescimento celular é observado, exceto no ensaio com petróleo. Nos ensaios com querosene, valores acima de 10% reduziram a produção de biossurfactantes, fato contrário ocorreu com a produção de proteína celular, como se observa na Tabela 9, onde a concentração igual a 30% de querosene estimulou o crescimento celular.

Entretanto, o valor 30% de óleo diesel estimulou a produção de biossurfactante e reduziu o crescimento celular. Pode-se inferir que o caminho metabólico foi direcionado para a produção de ramnolipídeos enquanto o desenvolvimento celular manteve-se estável. Durante os ensaios com petróleo, observou-se que tanto a maior produção de proteína celular quanto à maior produção de biossurfactantes ocorreram durante o cultivo com 10% desta fonte de carbono. Havendo assim, uma relação entre a produção de proteína celular e biossurfactante. A utilização de borra oleosa na concentração 5% favoreceu o crescimento celular, sendo este reduzido quando o resíduo foi utilizado em concentração superior, provavelmente devido à composição deste resíduo. Entretanto, a produção de biossurfactantes foi maior quando se utilizou 10% de borra oleosa. Pode-se inferir que a maior concentração do resíduo tenha causado uma condição de estresse e as células direcionaram seu metabolismo para a produção de biossurfactantes visando à disponibilização do resíduo como fonte de carbono e energia para a sobrevivência das células microbianas.

Tabela 11- Comparação entre os valores finais e porcentagem de redução da tensão superficial nos diferentes ensaios.

<i>Fonte de carbono</i>	<i>Tensão superficial inicial</i>	<i>Tensão superficial final</i>	<i>% de redução da tensão superficial</i>
<b>20% querosene</b>	60	33	<b>45</b>
<b>30% óleo diesel</b>	51	33	<b>36,5</b>
<b>10% petróleo</b>	57	35,5	<b>37,7</b>
<b>10% borra oleosa</b>	51	37	<b>27,4</b>

Os valores mais baixos de tensão superficial foram observados nos ensaios com 20% de querosene e em 30% de óleo diesel. Há uma discordância entre os dados obtidos para ramnose e a redução de tensão superficial no ensaio com querosene. Obteve-se uma maior quantidade de ramnose no ensaio com 10% de querosene, entretanto observou-se uma maior taxa de redução da tensão superficial no ensaio com 20% de querosene. A formação de emulsão separando em duas fases o meio de cultivo durante o ensaio com 20% de querosene pode ter interferido nas análises de ramnose, ficando esta subestimada por estar retida na emulsão. Ao final das 168 horas de

incubação, quando o caldo de cultivo foi submetido à centrifugação, a emulsão provavelmente liberou o biossurfactante antes retido por ela e este se tornou solúvel no sobrenadante do caldo de cultivo, fato que levou a esta diferença entre os valores de ramnose e tensão superficial final entre os ensaios.

Os valores encontrados para o ensaio com 30% de óleo diesel estão condizentes, pois nessa concentração se observou a maior produção de ramnose e também a maior redução na tensão superficial, tendo assim uma relação entre a quantidade de biossurfactante produzido e a redução de tensão superficial.

#### 5.4 Determinação do índice de emulsificação (E24)

O estudo de emulsificação foi realizado utilizando o sobrenadante livre de células do cultivo em 30% de óleo diesel, onde se obteve a maior quantidade de biossurfactante produzido, quantificado em termos de ramnose. Benzeno, querosene, óleo diesel e petróleo foram os hidrocarbonetos adicionados ao sobrenadante contendo o biossurfactante no intuito de avaliar o poder de emulsificação sobre estes compostos. Os procedimentos adotados estão descritos anteriormente. Verificou-se que todos os hidrocarbonetos avaliados foram emulsificados pelo biossurfactante, como se observa nas Figuras 25 e 26 e na Tabela 12.

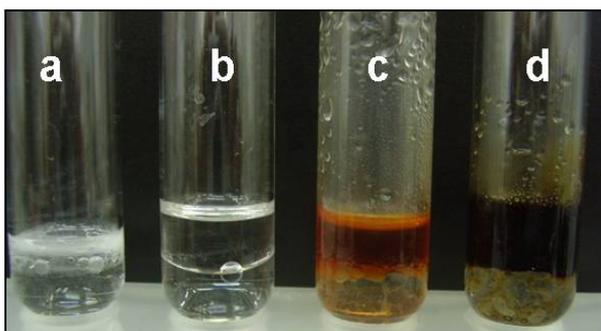


Figura 25- Controles a-) benzeno b-) querosene c-) óleo diesel d-) petróleo.

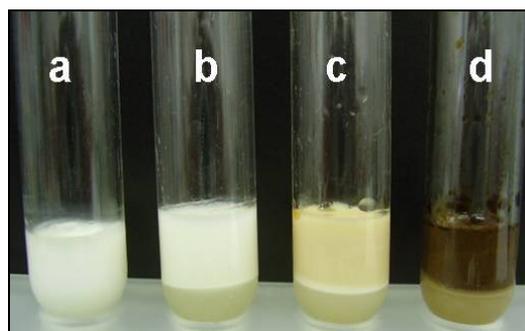


Figura 26- Após emulsificação a-) benzeno b-) querosene c-) óleo diesel d-) petróleo.

Tabela 12- Porcentagem de emulsificação.

Hidrocarbonetos avaliados	% de emulsificação
Benzeno	100
Querosene	66,7
Óleo diesel	70,6
Petróleo	68,7

### 5.5 Avaliação da estabilidade do biossurfactante produzido

Foram realizados ensaios em condições de temperatura ( $100^{\circ}\text{C}$ ), temperatura e pressão (1 atm,  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 min), salinidade (3,5% de NaCl) e variações de pH (3 a 10) com o sobrenadante livre de células obtido no ensaio com 30% diesel, para verificar a estabilidade das propriedades tensoativas nestas condições. Medidas da tensão superficial, revelaram que o biossurfactante manteve-se estável mesmo após 90 minutos de aquecimento a  $100^{\circ}\text{C}$  (Figura 27). Em relação ao pH, entre os valores 5 a 10, não ocorreu mudanças das propriedades tensoativas (Figura 28). Entretanto, abaixo do pH 5, observou-se início de precipitação do biossurfactante, fato este que elevou a tensão superficial. A condição salina e de pressão não alteraram a estrutura do biossurfactante, e este se manteve estável (Figura 29).

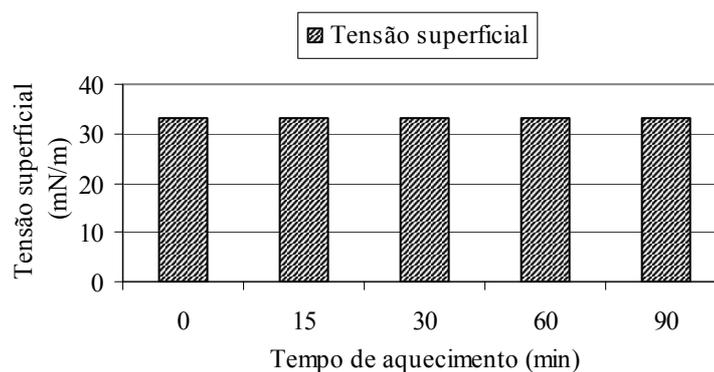


Figura 27- Aquecimento do caldo de cultivo contendo biossurfactante a  $100^{\circ}\text{C}$  em diferentes intervalos de tempo.

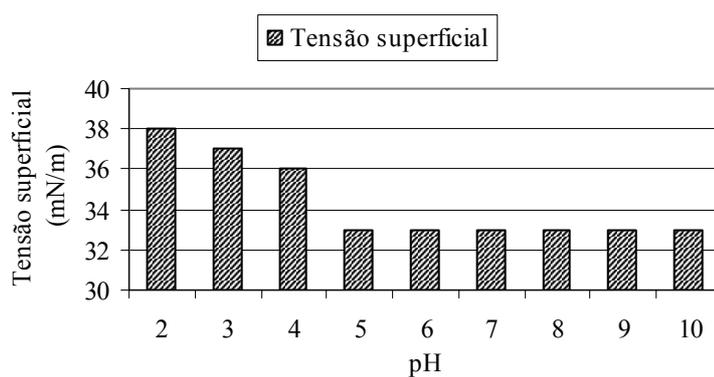


Figura 28- Caldo de cultivo contendo o biossurfactante submetido a valores diferentes de pH.

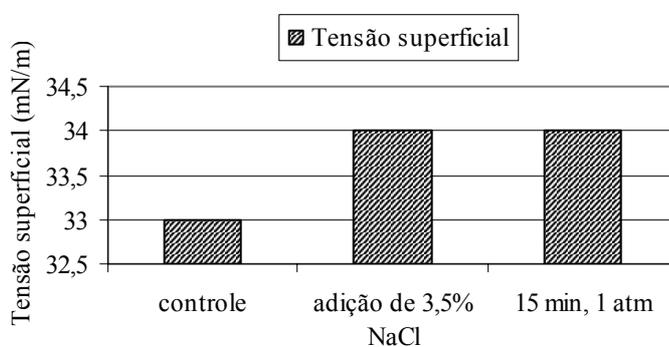


Figura 29- Condição salina e pressão sobre o caldo de cultivo contendo biossurfactante.

Makkar e Cameotra (1997) analisaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* cultivado durante 72 horas em meio de cultivo contendo 2% de sacarose como fonte de carbono. O sobrenadante deste ensaio foi submetido ao aquecimento a 100<sup>0</sup>C em diferentes intervalos de tempo, e o pH foi ajustado em diferentes valores. Observaram que mesmo após 2 horas de aquecimento, o caldo contendo o biossurfactante ainda manteve a atividade superficial (28-29 mN/m). Em relação ao pH, o caldo contendo o biossurfactante manteve suas propriedades tensoativas para os valores compreendidos entre 4,5 – 10.

## 6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permite concluir que:

- A bactéria *P. aeruginosa* LBI foi capaz de degradar os hidrocarbonetos utilizados neste estudo, com exceção de benzeno e tolueno.
- O ensaio contendo 20% de óleo diesel apresentou o maior valor de produção de proteína celular (5,56 g/L). O valor mais baixo de produção de proteína celular foi obtido no ensaio com 10% de petróleo (1,94 g/L).
- A produção de biossurfactantes em termos de ramnose durante o cultivo em 30% de óleo diesel foi de 2875,4 mg/L, sendo este o valor máximo obtido entre todos os ensaios. O menor valor obtido em termos de ramnose foi de 319,3 mg/L para o ensaio com 10% de borra oleosa.
- Observou-se que o aumento da concentração de biossurfactante produzido e excretado no meio de cultivo promoveu a redução da tensão superficial.
- Observou-se que a utilização da borra oleosa como substrato de baixo custo para a produção de biossurfactantes é viável, entretanto recomendam-se mais estudos utilizando esta matéria prima, para que haja uma otimização da produção.
- O biossurfactante produzido apresentou capacidade de emulsificação para os diversos hidrocarbonetos analisados. Deste modo, outras pesquisas empregando o biossurfactante em áreas contaminadas, podem verificar a aplicabilidade deste produto para biorremediação.

- As propriedades tensoativas foram mantidas a 100<sup>0</sup>C, pressão, salinidade e pH, podendo ser um biossurfactante promissor para aplicação em biorremediação e poços de petróleo.

## 7. REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR – 10004 – Resíduos Sólidos – Classificação**. 2004, 71p.

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.31, p.178-182, 1995.

BALBA, M.T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal Microbiology Methods**, Amsterdam, v.32, p.155-167, 1998.

BALDI, F.; IVOSEC, N.; MINAUI, A.; PEPI, M.; FANI, R.; SVETLICII, V.; ZUTII, V. Adhesion of *Acinetobacter venetians* to diesel fuel droplets studied with in situ electrochemical and molecular probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.2041-2048, 1999.

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

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.53, p.495-508, 2000.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, Elmsford, v.26, p.413-416, 2001.

BARBIERI, S. M. Biodegradação de compostos aromáticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. EMBRAPA, São Paulo. p. 211-242, 1997.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, Essex, v.95, p.15-18, 2004.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.54, p.283-288, 2002.

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**, Amsterdam v.85, p.1-8, 2004.

BOGNOLO, G. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v.152, p.41-52, 1999.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactant in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.50, p.520-529, 1998.

CHANDRASEKARAN, E.V.; BEMILLER, J.N. Constituent analysis of glycoaminoglycans. In: **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.III, Academic Press, New York, p. 89-96, 1980.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB, 2005. **Vazamentos de óleo**. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov/emergencia/acidentes/vazamento/vazamento.asp>>. Acesso em 09 ago. 2005.

DANIEL, H.J., OTTO, R.T., BINDER, M., REUSS, M., SYLDATK, C. Production of sophorolipids from whey: development of a two stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 e *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized concentrates as substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.51, p.40-45, 1999.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

DESAI, J.D.; DESAI, A.J. Production of Biosurfactants. In: Kosaric, N. Biosurfactants: production, properties, applications. New York: Ed. Marcel Dekker, 1993. p. 65-97.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.10, p.208-217, 1992.

GOSWAMI, P.; SINGH, H.D. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.37, p.1-11, 1990.

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

HANSON, K.G; DESAI, J.D.; DESAI, A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, Kew, v.7, n.10, p.745-748, 1993.

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v.48, n.2, p.422-427, 1972.

HOMMEL, R.K.; RATLEDGE, C. Biosynthetic Mechanisms of Low Molecular Weight Surfactants and Their Precursor Molecules. In: Kosaric, N. Biosurfactants: production, properties, applications. New York: Ed. Marcel Dekker, 1993. p.03-63.

IQBAL, S.; KHALID, Z.M.; MALIK, K.A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.21, p.176-179, 1995.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> and C<sub>14</sub> fractions). **Journal of Antibiotics**, Tokio, v.24, n.12, p.855-859, 1971.

ITOH, I.; SUZUKI, T. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. **Agr. Biol. Chem.**, v.36, n.12, p.2233-2235, 1972.

KOCH, A.K.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington v. 173, p.4212-4219, 1991.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.39, n.4, p.295-304, 2001.

LANG, S.; WAGNER, F. Bioconversion of Oil and Sugar to Glycolipids. In: Kosaric, N. Biosurfactants: production, properties, applications. New York: Ed. Marcel Dekker, 1993. p. 205-227.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.18, p.37-42, 1997.

MATSUFUJI, M.; NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.19, n.12, p. 1213-1215, 1997.

MERCADÉ, M.E., MANRESA, M.A., ROBERT, M. ESPUNY, M.J. ANDRÉS, C. GUINEA, J. Olive oil mill effluente (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, Essex, v.43, p.1-6, 1993.

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

PARRA, J.L.; GUINEA, J.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; COMELLES, F.; BOSCH, M.P. Chemical characterization and physico-chemical behavior of biosurfactants. **Journal Of The American Oil Chemists Society**, Chicago, v.66, n.1, p.141-145, 1989.

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

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkanes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, Essex, v.90, p.159-168, 2003.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M.E.; BOSH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.11, n.12, p. 871-874, 1989.

ROSATO, Y.B. Biodegradação do petróleo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. EMBRAPA, São Paulo. p.307-304, 1997.

ROSEMBERG, E.; RON, E.Z. High and low molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v.52, n.2, p.154-162, 1999.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.19, n.2, p.159-166, 2002.

SHIM, H; YANG, S. T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in fibrous-bed bioreactor. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 67, p. 99-112, 1999.

SIM, L.; WARD, O.P.; LI, Z.Y. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, p.232-238, 1997.

SU, J.J.; KAFKEWITZ, D. Toluene and xylene degradation by a denitrifying strain of *Xanthomonas maltophilia* with limited or no oxygen. **Chemosphere**, Oxford, v.32, n.9, p. 1843-1850, 1996.

TUMMLER, K.; EFFENBERG, F.; SYLDATK, C. An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and L-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas* sp. DSM 2874. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.105, p. 563–571, 2003.

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

ZHANG, G.; WU, Y.; QIAN, X.; MENG, Q. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, Hangzhou, v.6B, n.8, p.725-730, 2005.