

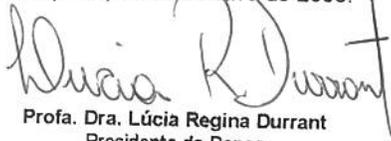
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**ESTUDO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS
POR LEVEDURAS ISOLADAS DE SOLO**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Gabriela Mishima Honório**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de outubro de 2003.

Campinas, 03 de outubro de 2003.


Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
Presidente da Banca

GABRIELA MISHIMA HONÓRIO
Bióloga

PROF^a. DR^a. LÚCIA REGINA DURRANT
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas/SP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

200333764

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Regina Durrant

(Orientadora)



Prof. Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti

(Membro)



Prof.^a. Dr.^a. Marta Cristina Teixeira Duarte

(Membro)

Prof.^a. Dr.^a. Doralice de Souza Luro Balan

(Membro)

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Durrant pela orientação, confiança e paciência.

Ao Prof. Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti, à Prof^a. Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte e à Prof^a. Dr^a. Doralice de Souza Luro Balan, pelas sugestões, correções e presteza.

À CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos (Biblioteca, Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos e Secretaria de Pós-Graduação), pelo auxílio, competência, atenção e extrema paciência.

Aos grandes amigos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pelo carinho, apoio, sinceridade, lealdade, auxílio, alegria, companheirismo, coragem...

Aos meus amados pais, pela maravilhosa herança de incentivo a minha formação e pela confiança depositada em mim.

Ao meu querido Gustavo, que mesmo não tendo acompanhado este trabalho desde o início, deu-me o apoio necessário para continuar, sempre.

À Hélvia, à Sandra, à Irene e à Mariana, que, em maior ou menor distância, sempre torceram pelo meu sucesso.

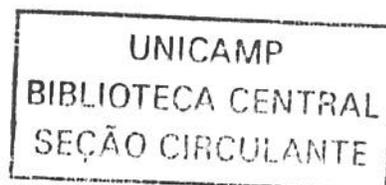
Ao Sr. "Secreta", da Oficina Sacchi & Santos, pela compreensão deste trabalho e fornecimento das amostras de efluente.

A todos aqueles que cruzaram meu caminho durante esta longa jornada e que, de uma forma ou de outra, auxiliaram em meu desenvolvimento.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	v
ÍNDICE DE TABELAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Contaminações ambientais	4
2.2. Tratamentos biológicos	4
2.3. Biosurfactantes e biorremediação.....	6
2.4. Microrganismos produtores de biosurfactantes.....	9
2.4.1. Bactérias	11
2.4.2. Fungos	12
2.4.3. Leveduras	13
2.5. Determinação de poluentes industriais	16
3. MATERIAL	18
3.1 Meios de cultura	18
3.1.1. Meio Potato Dextrose Agar (PDA).....	18
3.1.2. Meio Yeast Malt Agar (YMA)	18
3.1.3. Meio Glicose Yeast Peptone (GYP)	18
3.1.4. Meio basal de sais.....	19
3.1.5. Efluente coletado de oficina	19

3.2. Microrganismos	20
4. METODOLOGIA.....	22
4.1. Manutenção das culturas	22
4.2. Comportamento das linhagens crescidas no efluente oleoso sob diferentes condições de cultivo	22
4.2.1. Influência da concentração da fonte de carbono	22
4.2.2. Influência das condições de tratamento da fonte de carbono	23
4.3. Produção de biosurfactantes	24
4.4. Determinação da atividade de emulsificação	25
4.5. Determinação da variação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)	25
4.6. Produção de massa celular das linhagens selecionadas	26
4.7. Determinação da variação do pH	27
4.8. Determinação da atividade dos biosurfactantes	27
4.9. Produção e extração dos biosurfactantes	27
4.9.1. Influência da concentração da fonte de carbono na análise dos biosurfactantes produzidos	28
4.9.2. Influência da concentração da fonte de carbono sobre a Demanda Química de Oxigênio (DQO)	29
4.9.3. Extração dos biosurfactantes produzidos	29
4.10. Análise dos biosurfactantes em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	30
4.11. Identificação das linhagens selecionadas	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1. Seleção das linhagens de leveduras por meio de diferentes fatores determinantes	32
5.1.1. Influência da concentração da fonte de carbono e composição do meio basal no crescimento das linhagens	32
5.1.2. Determinação da atividade de emulsificação geral	33
5.1.3. Determinação da variação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)	39



5.2. Produção de massa seca das linhagens selecionadas.....	43
5.3. Determinação da atividade de emulsificação das linhagens selecionadas.....	45
5.4. Variação do pH do meio cultivado com as linhagens selecionadas	47
5.5. Produção e extração dos biosurfactantes.....	48
5.5.1. Influência da concentração da fonte de carbono na análise dos biosurfactantes produzidos.....	48
5.5.2. Influência da concentração da fonte de carbono na remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	53
5.5.3. Extração dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens LD e L7A	54
5.5.3.1. Extração por acidificação	55
5.5.3.2. Extração com clorofórmio (2:1)	56
5.5.3.3. Extração com clorofórmio - metanol (2:1:3).....	56
5.6. Análise dos biosurfactantes em Cromatografia de Camada Delgada.....	58
5.7. Identificação das leveduras selecionadas.....	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7. BIBLIOGRAFIA	63
8. APÊNDICES.....	69
APÊNDICE 1: Médias das duplicatas das alturas de halos alcançados, de cada amostra	69
APÊNDICE 2: Médias das duplicatas de DQO encontrados para cada amostra	70
APÊNDICE 3: Valores em porcentagem das variações de DQO durante os 4 ensaios diferentes.....	71
APÊNDICE 4: Resultados do crescimento de L7A, L9A e LD em experimentos de até cinco dias de cultivo	72
APÊNDICE 5: Resultados do tratamento de L7A e LD em experimentos com cinco dias de cultivo, sob 2 concentrações de efluente	73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Efetividade de vários produtos biosurfactantes em comparação com surfactantes sintéticos	8
Tabela 2.2: Biosurfactantes produzidos por vários microrganismos.....	10
Tabela 2.3: Comparação das propriedades de emulsificação e de estabilização	15
Tabela 3.1: Composição do meio sólido Yeast Malt Agar (YMA).....	18
Tabela 3.2: Composição do meio sólido meio Glucose Yeast Peptone (GYP)	18
Tabela 3.3: Composição do meio sólido meio basal de sais	18
Tabela 3.4: Leveduras isoladas de amostras de solo contaminado próximo à refinaria de petróleo de Paulínia, SP.....	21
Tabela 5.1: Resultado do experimento de seleção em meio contendo efluente oleoso.....	33
Tabela 5.2: Testes de emulsificação dos biosurfactantes das linhagens LD e L7A em diferentes concentrações da fonte de carbono	56

ÍNDICE DA FIGURAS

Figuras 3.1 (A), (B) e (c): Tanques de decantação da oficina de caminhões-tanque, localizada na estrada Campinas-Paulínia, km 121, SP	20
Figuras 5.1 (A) e (B): Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 1 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos e centrifugado a 20.000 g por 20 minutos).(A) Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e (B) Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 1.....	34
Figuras 5.2 (A) e (B): (a) Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 2 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos sem ser centrifugado) (A) Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e (B) Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 2.....	35
Figuras 5.3 (A) e (B): (a) Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 3 (sem esterilização, sendo centrifugado). (A) Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e (B) Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 3.....	36
Figuras 5.4 (A) e (B): Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 4 (sem esterilização, sem centrifugação). (A) Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e (B) Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 4.....	37
Figura 5.5: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 1 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos e centrifugado a 20.000 g por 20 minutos)	40
Figura 5.6: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 2 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos sem ser centrifugado)	40

Figura 5.7: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 3 (sem esterilização, sendo centrifugado).....	41
Figura 5.8: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 4 (sem esterilização, sem centrifugação).....	41
Figura 5.9: Biomassa produzida após crescimento das linhagens por 144 horas.....	44
Figura 5.10: Variação da absorvância (A_{610}) das linhagens selecionadas, ao longo de 144 horas.	45
Figura 5.11: Variação da altura dos halos formados pela emulsificação das linhagens selecionadas, ao longo de 144 horas.	46
Figura 5.12: Variação do pH das linhagens selecionadas ao longo de 144 horas.	47
Figura 5.13: Variação do pH para a linhagem LD em diferentes concentrações da fonte de carbono.	49
Figura 5.14: Variação do pH para a linhagem L7A em diferentes concentrações da fonte de carbono.	49
Figura 5.15: Testes de emulsificação da linhagem LD em diferentes concentrações da fonte de carbono.....	50
Figura 5.16: Testes de emulsificação da linhagem L7A em diferentes concentrações da fonte de carbono.....	51
Figura 5.17: Resultados de testes de emulsão com a fase aquosa dos meios de cultivo, após 120 horas. (a) controle abiótico com efluente a 25%, (b) LD a 25%, (c) LD a 50%, (d) L7A a 25%, (e) L7A a 50% e (f) controle abiótico com efluente a 50%.....	51
Figura 5.18: Tensão superficial pelo biosurfactante da linhagem LD.....	52

Figura 5.19: Variação da tensão superficial pelo biosurfactante da linhagem L7A.....	52
Figura 5.20: Comparação da redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO) em diferentes tempos de tratamento e concentração.	54
Figura 5.21: Comparação entre as diferentes extrações para as linhagens LD e L7A.	55
Figura 5.22: Testes de emulsificação com biosurfactante obtido por acidificação. (a) Linhagem LD com efluente a 25%, (b) LD a 50%, (c) L7A a 25% e (d) L7A a 50%.	55
Figura 5.23: Biosurfactantes da linhagem LD liofilizados após extração com clorofórmio-metanol.....	57
Figura 5.24: Biosurfactantes da linhagem L7A liofilizados após extração com clorofórmio-metanol.....	57
Figura 5.25: Perfil da cromatografia em camada delgada da linhagem LD. A = LD 25%-clorof., B=LD 25%-metanol, C = LD 50%-clorof., D = LD 50%-metanol, E = padrões de açúcares, F = padrões de aminoácidos, G = óleo de soja, H = óleo de oliva. Rodamina 6G = manchas em amarelo. Ninidrina = manchas em rosa. Azul de molibdênio = manchas em azul.....	59
Figura 5.26: Perfil da cromatografia em camada delgada da linhagem L7A. A = L7A 25%-clorof., B=L7A 25%-metanol, C = L7A 50%-clorof., D = L7A 50%-metanol, E = padrões de açúcares, F = padrões de aminoácidos, G = óleo de soja, H = óleo de oliva. Rodamina 6G = manchas em amarelo. Ninidrina = manchas em rosa. Azul de molibdênio = manchas em azul.....	59

Figura 5.27: Linhagens de leveduras selecionadas, crescidas em meio sólido. (a) Linhagem L7A crescida em meio PDA, por 48 horas; (b) Linhagem LD crescida em meio GYP, por 48 horas..... 60

RESUMO

Alta especificidade, toxicidade baixa e biodegradabilidade são alguns dos fatores que têm transformado os biosurfactantes em importantes ferramentas de estudo pelos laboratórios de biodegradação mundiais. Bioprodutos obtidos pelo crescimento de fungos, leveduras e bactérias, ao consumir diferentes tipos de hidrocarbonetos, estes compostos possuem ampla aplicação econômica, abrangendo desde sua utilização em indústria alimentícia até o uso em processos de biorremediação, seja por utilização em vazamentos de óleo, seja por tratamento de efluentes industriais.

Duas linhagens de leveduras do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM), *Geotrichum terrestre* (LD) e *Cryptococcus* sp (L7A), foram selecionadas como produtoras de biosurfactantes quando crescidas em frascos agitados utilizando, como fonte de carbono, efluente de baixo custo proveniente de uma oficina de reparo de caminhões, sob 2 concentrações diferentes, 50 % e 25 % (v/v).

Dentre 26 linhagens de leveduras isoladas do solo (em estudos prévios do LSFM), as 2 linhagens foram selecionadas após análises prévias quanto a sua capacidade de crescimento em presença deste efluente e medição da atividade emulsificante. Também foi avaliada a síntese de biosurfactantes extracelulares, pela redução da tensão superficial da água, bem como a sua habilidade em degradar compostos oleosos, avaliada através da redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO).

SUMMARY

High specificity, low toxicity and biodegradability are some factors that have been made biosurfactants important study instruments for the world biodegradation laboratories. As hydrocarbons growing bioproducts from fungus, yeasts and bacterial, these substances own extense economic application, from food industry to bioremediation processes, in oil spills and industrial effluent treatment.

Two yeast strains from Systematic and Microbial Physiology Laboratory (SMPL), *Geotrichum terrestre* (LD) e *Cryptococcus* sp (L7A), were selected as biosurfactant producers when grown in shake flasks utilizing, as carbon source, low cust effluent from a petrol tanker garage, under 2 different conditions of effluent volume concentration, 50 % e 25 % (v/v).

Between 26 yeast soil strains (from SMPL culture collection), both strains were selected by their growing capacity in this effluent and emulsifying activity. Either, extracellular biosurfactants sinthesys was mainly estimated by the reduction of water superficial tension, as well as its ability on oil compounds biodegradation, evaluated by Chemical Oxygen Demand reduction.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos tempos, um grande avanço tecnológico no desenvolvimento de diversos componentes químicos vem sendo alcançado pelas indústrias, com o objetivo de intensificar a economia dos países desenvolvidos e, também, dos que se encontram em desenvolvimento. Contudo, nem sempre este progresso tecnológico vem acompanhado de perto por um processo de preservação e cuidado ambiental, principalmente quando enfocado o problema da disposição e tratamento dos resíduos gerados.

Eventualmente, ao entrar em contato com o meio ambiente, alguns destes compostos podem apresentar certa dificuldade de serem degradados e vêm a se tornar, então, compostos recalcitrantes, contaminantes de solo, ambientes aquáticos e aéreos. Outros, mesmo sendo mais facilmente degradáveis, como gorduras, proteínas, carboidratos, quando em excesso, acarretam semelhante problema ao ambiente. Uma grande quantidade destes compostos é lançada todos os dias em afluentes de bacias hidrográficas, sem que haja um tratamento prévio, aumentando o volume de compostos oleosos nos ambientes aquáticos. O difícil processo de decomposição pode passar, então, a ser efetuado por uma via biológica, através de microrganismos responsáveis por sua biodegradação. Por meio de uma série de reações bioquímicas, produção de enzimas, catalisadores e substâncias surfactantes, microrganismos responsáveis pela biodegradação dos compostos oleosos atuam no sentido de reduzir ou, ao menos, estabilizar o volume destes materiais poluidores.

Além de servir como ferramenta no processo de biodegradação, tais microrganismos vêm, também, sendo estudados para serem utilizados biotecnologicamente em indústrias de alimentos, de cosméticos, de fármacos e na exploração de reservas de petróleo e síntese de seus derivados.

O desenvolvimento e utilização de compostos surfactantes biologicamente obtidos vêm, aos poucos, ganhando espaço no processamento de produtos industrializados,

competindo com surfactantes sinteticamente produzidos (FALATKO e NOVAK, 1992). Seu uso não é bem difundido industrialmente em razão dos custos dos processos de produção, ainda pouco praticáveis, quando comparados aos obtidos na produção de surfactantes quimicamente sintetizados (KIM et al., 1997; FERRAREZO, 1998).

Contudo, a aplicação industrial destes produtos, obtidos por meio de estudos em biotecnologia, representa grande potencial econômico a longo prazo; para isto, levam-se em conta fatores como sua baixa toxicidade, a biodegradabilidade destes compostos orgânicos e, após otimização dos processos de produção, alta produtividade pelos microrganismos e alta atividade dos biosurfactantes biotecnologicamente obtidos (KIM et al., 1997). Indiretamente, facilitam o crescimento de outros microrganismos em hidrocarbonetos e a produção de produtos úteis, como por exemplo, proteínas unicelulares, as SCP (“single-cell protein”), bem como um grande número de aminoácidos individuais, açúcares e polissacarídeos, ácidos nucléicos, vitaminas e pigmentos.

A biorremediação e a dispersão de óleos após derramamento seriam duas possíveis aplicações ambientais para estes compostos; em indústria petrolífera, a exploração e transporte de óleo e derivados, na limpeza e manutenção de tanques são aplicações economicamente desejáveis que vêm sendo bastante estudadas (BANAT et al., 1991; FALATKO e NOVAK, 1992; BANAT, 1995; RUDD et al., 1996). Como outras aplicações industriais, vê-se o uso de sua ação emulsificante em indústrias de alimentos (bioemulsificantes e estabilizantes amplamente utilizados), cosméticos (“bio-cosméticos”) e farmacêuticas (baseado em seu efeito antibiótico) (ZHOU e KOSARIC, 1995; KIM et al., 1997; MAKKAR e CAMETROA, 2002).

Estas pesquisas vêm sendo realizadas, a despeito dos altos custos ainda envolvidos, como uma resposta à crescente demanda mundial por fontes alternativas de substâncias de aplicação industrial, mais baratas e menos agressivas ao ambiente.

Neste sentido, este projeto de mestrado tem por objetivo a avaliação da produção de compostos emulsificantes por 26 linhagens de leveduras (identificadas como

produtoras de biosurfactantes quando crescidas em tolueno, vaselina, óleo diesel e de oliva em estudos anteriores realizados no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, LSFM - FEA/UNICAMP), comprovando sua efetividade como biodegradadoras, indo de encontro à crescente necessidade de produtos melhores e economicamente mais acessíveis.

O presente estudo buscou selecionar linhagens de leveduras capazes de produzir biosurfactantes extracelulares e degradar compostos oleosos, através da fermentação das linhagens e determinação da massa celular produzida, com culturas crescidas em fermentadores rotatórios (shakers). Além disto, como efeito de complementação do estudo, procurou-se fazer uma caracterização parcial dos biosurfactantes produzidos pelas leveduras selecionadas, com base em sua possível composição química.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONTAMINANTES AMBIENTAIS

É sabido que determinados compostos químicos (líquidos, sólidos e gasosos), podem vir a se tornar poluentes no ambiente, acumulando-se sem que haja sua devida degradação. Tais substâncias modificam propriedades da água, do solo e ar, exercendo efeitos tóxicos em praticamente todo tipo de ser vivo. Neste caso, são exemplos a toxicidade provocada por efluentes industriais, processos químicos que liberam compostos fenólicos, amônia, vazamentos acidentais de dejetos de indústrias petroquímicas, de pesticidas e fármacos.

Estes compostos têm seu comportamento analisado em relação ao ambiente, quanto a sua capacidade de agressão, baseando-se em 2 fatores: a sua **biodegradabilidade** e sua **toxicidade** (PITTER e CHUDOBA, 1990). Deste modo, os compostos orgânicos podem ser classificados em:

- Facilmente degradáveis e não tóxicos;
- Facilmente degradáveis e tóxicos;
- De difícil degradação e não tóxicos;
- De difícil degradação e tóxicos.

Testes vêm sendo realizados por laboratórios interessados em conseguir métodos de degradação destes compostos recalcitrantes (COOPER e GOLDENBERG, 1987; HOROWITZ et al, 1990; JACOBUCCI, 2000; KUSHIDA, 2000).

2.2. TRATAMENTOS BIOLÓGICOS

O tratamento biológico de alguns efluentes industriais pode ser difícil por sua inerente persistência à degradação e alto potencial poluente. Como exemplo, podem ser citados os efluentes de indústria de óleo de oliva, que representam fonte de poluição

considerável para a região do Mediterrâneo e pode alcançar sua degradação através de metodologias alternativas, como a aplicação de consórcios microbianos (ZOUARI e ELLOUZ, 1996).

Outro exemplo no qual microrganismos poderiam ser utilizados numa via biológica de degradação, seria no tratamento do efluente altamente colorido, proveniente do processo de destilação alcoólica da cana-de-açúcar (KUMAR et al., 1998). Este resíduo, além de possuir uma forte coloração marrom escura formada por polímeros de melanoidinas resultantes de reação de Maillard, apresenta dificuldade em ser tratado por meio de processos biológicos tradicionais como o de lodo ativado, possuindo alta carga de DQO. Estes compostos possuem propriedades antioxidantes, extremamente tóxicas para microrganismos comumente utilizados em tratamentos de efluentes, dificultando seu tratamento.

Da mesma forma, a produção de petróleo e derivados apresenta altos custos que poderiam ser minimizados ao se considerar o problema de depósitos de detritos de óleo e limpeza de lodos formados nos tanques reservatórios. Ambos os problemas ocorrem pelo fato de que nenhum deles é efetivamente retirado dos tanques pelo sistema de bombas, fazendo necessária a limpeza manual, periodicamente. Neste ponto, estudos sobre a produção de biosurfactantes vêm sendo desenvolvidos no sentido de se conseguir a recuperação de grande porcentagem de óleo a partir de lodos além de sua efetiva limpeza (BANAT et al., 1991).

Outro problema, com sérias implicações econômicas, pode ser identificado na exploração de petróleo: a adsorção deste óleo nas superfícies, onde é retido por ação da capilaridade, como uma fase separada, dificultando sua extração (FALATKO e NOVAK, 1992). O uso de microrganismos e/ou seus produtos metabólicos, o que vem sendo chamado de MEOR ("microbial enhanced oil recovery"), poderia aumentar a recuperação do óleo residual em reservatórios, seja pela introdução direta de microrganismos produtores de biosurfactantes (ou dos biosurfactantes destes, produzidos em reatores), ou seja pela injeção de nutrientes, estimulando o crescimento de microrganismos

endógenos (BANAT, 1995). O uso de surfactantes químicos, neste caso, não seria efetivo, pois além de envolver altos custos, seria arriscado e deixaria no ambiente resíduos indesejáveis, cuja disposição no ambiente seria danosa por si só.

O petróleo e seus derivados são comumente considerados poluentes ambientais de regiões marinhas, terrestres e atmosféricas, e seu processo de remoção mais importante é a degradação microbiológica de hidrocarbonetos. Até hidrocarbonetos halogenados, produtos sintéticos particularmente perigosos, podem ser desalogenados por microrganismos que utilizam compostos oleaginosos para crescer. Embora a maior parte do petróleo e dos óleos contaminantes possa ser biodegradada rápida e simultaneamente, alguns componentes tendem a persistir por muito mais tempo; neste último caso, a degradação pode acontecer de forma fracionada, sob diferentes taxas de degradação (RADWAN e SORKHOH, 1993; SAMPAIO, 1995).

Contudo, o uso de microrganismos e seus produtos pelo setor industrial ainda é limitado pelo receio de se lidar com o crescimento e controle da produção (BANAT, 1995). Estes poderiam ser utilizados em remediação de solos e efluentes contaminados por metais, controle da poluição em derramamentos de óleos, mobilização de lodos e exploração de petróleo (PITTER e CHUDоба, 1990; BANAT, 1995; RUDD et al., 1996, KUSHIDA, 2000).

2.3. BIOSURFACTANTES E BIORREMEDIAÇÃO

Um importante processo que pode ser desencadeado pelo crescimento industrial, é o tratamento de efluentes industriais dispostos no meio ambiente. Indústrias de alimentos cujos resíduos contêm grandes volumes de resíduos protéicos e lipídicos, como por exemplo, as de laticínios, frigoríficos e abatedouros de aves, poderiam se beneficiar da utilização da degradação biológica de seus efluentes, tanto pela inoculação de certa quantidade de microrganismos exógenos como pela adição de seus metabólitos com propriedades surfactantes ou, então, nutrientes necessários para seu desenvolvimento (KUSHIDA, 2000).

Pode-se, igualmente, promover a biodegradação de efluentes industriais pela introdução de biosurfactantes diretamente no ambiente, melhorando a captação do substrato pelos microrganismos naturais do local. Os custos deste último processo seriam incrivelmente diminuídos se fossem utilizados, como fonte de carbono, efluente industrial, como por exemplo, soro (4 a 5% de carboidratos), produzido durante o processamento de queijos (ZHOU e KOSARIC, 1995).

O uso de biosurfactantes pode representar grande potencial econômico a longo prazo, bem como enriquecer seu apelo ambiental em relação aos surfactantes quimicamente obtidos; para isto, levam-se em conta fatores como sua baixa toxicidade, a biodegradabilidade destes compostos orgânicos e, após otimização dos processos de produção, alta produtividade pelos microrganismos e alta atividade dos biosurfactantes biotecnologicamente obtidos (KIM et al., 1997; MULLIGAN et al., 2001; MAKKAR e CAMETROA, 2002). BANAT (1995) comparou a efetividade dos biosurfactantes em relação aos surfactantes químicos, mostrando que aqueles obtidos biologicamente compartilham das mesmas propriedades dos surfactantes sintéticos, como pode ser observado na Tabela 2.1.

Nos dias atuais, o uso de dispersantes químicos e jatos da água quente sob pressão ainda é o método mais utilizado para se conseguir a limpeza dos locais afetados por grandes derramamentos de óleo, como o ocorrido em outubro de 2002, quando o petroleiro "Prestige" partiu-se na costa da Espanha, espalhando cerca de 17 mil toneladas de óleo no Mar Mediterrâneo. Suas conseqüências são observadas até os dias de hoje, pois o cargueiro afundou mantendo milhares de toneladas de óleo em seus tanques que, com a ação do mar, estão enferrujando e continuam liberando mais óleo para a superfície, afetando não só a fauna marinha, mas a própria saúde dos habitantes locais, que dependem da pesca pra sua sobrevivência.

O uso de biosurfactantes em aplicações ambientais como na dispersão de óleos em derramamentos e contaminação de solos vem sendo pesquisado, em razão da necessidade de utilização industrial de produtos químicos não agressivos ao ambiente

(SUNDARAM et al., 1994; JACOBUCCI, 2000). Desta forma, o estudo do comportamento destes biosurfactantes tem como foco a degradação de óleos provenientes de vazamentos, exploração e limpeza de reservatórios de óleos, além da redução de sua viscosidade para transporte (KIM et al., 1997).

Tabela 2.1: Efetividade de vários biosurfactantes em comparação com surfactantes sintéticos.

Agente	Tensão superficial (mN/m)	Tensão interfacial (mN/m)	Concentração crítica micelar
Biosurfactantes			
Celobiose lipídeos	30,0	>1,0	20,0
Ramnilipídeos	40,0	1,5	50,0
Soforolipídeos	37,0	1,5	82,0
Trealose dimicolato	30,0	18,0	0,7
Trealose 6-micolato	30,0	15,0	165,0
Hidróxi ácido graxo	30,0	15,0	200,0
Surfactina	27,0	1,8	25,0
Ácido corinomicólico	30,0	2,0	150,0
Proteína-lipídeo- carboidrato	35,0	15,0	1900,0
Produto PE-1006	30,0	5,6	70,0
Produto ST-5	27,0	1,8	30,0
Produto AB-2	28,0	1,5	35,0
Surfactantes sintéticos			
Span-20	32,0	5,0	10,0
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	30,0	0,01	2500,0
Sulfonatos de petróleo	30,0	0,001	ND

ND: não detectado
Fonte: Banat, 1995.

Os compostos destinados à assimilação pelos microrganismos são usualmente degradados em solução aquosa ou, pelo menos, quando em contato direto com água (SUNDARAM et al., 1994). Ao se inocular microrganismos degradadores com a finalidade de limpeza de extensões de derramamento de óleo, tanto em meio aquático quanto em meio terrestre, este irá produzir biosurfactantes para solubilizar o óleo, aumentando a área superficial, e utilizá-lo como substrato para seu crescimento além de funcionar bem em sua dispersão (RON e ROSENBERG, 2002). Contudo, é importante lembrar que tais microrganismos podem causar problemas ao contaminar tanques de combustíveis, dispersar água e causar corrosão das paredes destes tanques de contenção (COOPER e ZAJIC, 1980; BANAT, 1995).

2.4. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES

Uma enorme variedade de microrganismos tem sido estudada e relatada na literatura como produtora de compostos emulsificantes e biosurfactantes (KOSARIC et al., 1987; BANAT, 1995), como pode ser constatado na Tabela 2.2.

Bactérias, leveduras e fungos podem ser isolados a partir de amostras ambientais de regiões que sofreram alguma forma de contaminação por efluentes industriais, esgotos e resíduos químicos. Tais microrganismos são, dessa forma, considerados como possíveis biodegradadores e estudados por sua capacidade de assimilação de compostos poluentes. Isto se dá pela produção de moléculas anfipáticas, com uma parte hidrofílica (polar) e uma cauda lipofílica (apolar), capazes de alterar as propriedades interfaciais entre fases imiscíveis, reduzindo-as e facilitando a captação dos substratos oleosos pelas células dos microrganismos (HOROWITZ et al., 1990; SAMPAIO, 1995).

No entanto, os biosurfactantes produzidos são diretamente influenciados, tanto no tipo quanto na quantidade e qualidade obtidas, por fatores como condições de cultivo e natureza da fonte de carbono, bem como sua concentração (BANAT, 1995; CARVALHO et al., 1998). Enquanto fungos filamentosos e leveduras degradam preferencialmente n-alcenos saturados não ramificados, algumas bactérias são capazes de degradar

isoalcanos e cicloalcanos, assim como compostos insaturados e aromáticos (KOSARIC et al., 1987; KUSHIDA, 2000).

Tabela 2.2: Biosurfactantes produzidos por vários microrganismos

MICROORGANISMO	BIOSURFACTANTE
<i>Arthrobacter</i> RAG-1	heteropolissacarídeos
<i>Arthrobacter</i> MIS38	lipopeptídeo
<i>Arthrobacter</i> sp	trealose, sacarose e frutose lipídeos
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	lipopeptídeos
<i>Bacillus licheniformis</i> 86	lipopeptídeos
<i>Bacillus subtilis</i>	surfactina
<i>Bacillus pumilus</i> A1	surfactina
<i>Bacillus</i> sp AB-2	ramnolipídeos
<i>Bacillus</i> sp C-14	hidrocarboneto-lipídeo-proteína
<i>Candida antarctica</i>	lipídeo manosil eritritol
<i>Candida bombicula</i>	soforose lipídeo
<i>Candida tropicalis</i>	manose-ácidos graxos
<i>Candida lipolytica</i> Y-917	soforose lipídeo
<i>Clostridium pasteurianum</i>	lipídeos neutros
<i>Corynebacterium hydrocarbolastus</i>	proteína-lipídeo-hidrocarboneto
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	fosfolipídeos
<i>Corynebacterium lepus</i>	ácidos graxos
<i>Nocardia erythropolis</i>	lipídeos neutros
<i>Ochrobactrum anthropii</i>	proteína
<i>Penicillium spiculisporum</i>	ácido espiculospórico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ramnolipídeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	lipopeptídeo
<i>Phaffia rhodozima</i>	carboidrato-lipídeo
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	dicorinomicolato trealose
<i>Rhodococcus</i> sp ST-5	glicolípide
<i>Rhodococcus</i> sp H13-A	glicolípide
<i>Rhodococcus</i> sp 33	polissacarídeo
<i>Torulopsis bombicula</i>	soforose lipídeos

Fonte: Banat, 1995.

Desta forma, um amplo conjunto de produtos obtidos biologicamente pode encontrar aplicações industriais, como, por exemplo, biosurfactantes resistentes às variações de pH, salinidade e pressão, surfactantes com propriedades antimicrobianas e antifúngicas e emulsificantes naturais para alimentos, sendo atóxicos e biodegradáveis (SHEPHERD et al, 1995; VELRAEDS et al, 1996; ABD-ALLAH e SRORR, 1998).

Resumidamente, existem cerca de cinco principais classes de biosurfactantes (COOPER e ZAJIC, 1980; KOSARIC et al., 1987; BOGNOLO, 1999):

- Ácidos graxos substituídos (com ligações cruzadas ou hidroxilados) e lipídeos neutros, como por exemplo, ácidos corinomicólicos, proteínas hidrofóbicas e ácidos lipoprotéicos.
- Fosfolipídeos, embora presentes nos microrganismos, existem poucos exemplos de produção extracelular, como os biosurfactantes produzidos por *Corynebacterium lepus*.
- Glicolipídeos, como trealose e soforose lipídeos, envolvidos na captação de hidrocarbonetos de baixa polaridade.
- Lipoproteínas ou lipopeptídeos, como ornitina lipídeos e subtilisina, de *Bacillus subtilis*.
- Lipopolissacarídeos complexos, como os emulsificantes de alto peso molecular produzidos por *Acinetobacter calcoaceticus*.

2.4.1. Bactérias

As bactérias representam parte considerável dos estudos feitos com microrganismos produtores de biosurfactantes.

Bactérias do gênero *Rhodococcus*, isoladas de amostras de solo contaminado do Kuwait, foram analisadas quanto a suas necessidades nutricionais e características de crescimento em meio contendo 2% (v/v) de n – parafina como única fonte de carbono. Tais bactérias produziram biosurfactantes capazes de reduzir a tensão superficial até 27 mN/m, dependendo do tipo de fonte de carbono utilizada, do pH e da temperatura utilizados (ABU – RUWAIDA et al., 1991). BICCA et al. (1999) estudaram as cepas de *Rhodococcus ruber* AC74, *R. ruber* AC87, *R. ruber* AC239, *R. erythropolis* AC265 e *R. erythropolis* AC272, quantificando sua produção de biosurfactantes por meio da medição da tensão superficial e índice de emulsificação, além de investigar a influência de condições ambientais como pH, temperatura, composição do meio e tipo de fonte de

carbono. Foi conseguida uma redução da tensão superficial por volta de 20 dynes/cm, enquanto que o índice de emulsificação ficou em cerca de 60 %, chegando até 63 %, no caso da cepa *R. ruber* AC239, indicando que esta poderia ser utilizada diretamente em derramamentos de óleo no meio ambiente ou na produção biotecnológica do biosurfactante.

CARVALHO et al. (1998) demonstraram que as bactérias *Chromobacterium* sp, *Planococcus citreus* e *Bacillus* sp podem sintetizar metabólitos que apresentam características emulsificantes ótimas, quando crescidas em meios de cultivo contendo querosene, vaselina ou óleo de oliva a 1,5% (v/v). O trabalho também evidenciou que concentrações das fontes de carbono maiores que 1,5 % (3 % e 5 %) poderiam ter um efeito negativo nas atividades emulsificantes dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens de *P. citreus* e *Bacillus* sp.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, estudada por WU e JU (1998), mostrou-se capaz de produzir o biosurfactante ramnolipídeo sob limitação da fonte de nitrogênio, na fermentação em n – hexadecano. Para se isolar e identificar as estruturas constituintes deste biosurfactante e, conseqüentemente, confirmar a produção do ramnolipídeo, o material foi acidificado e extraído com acetato de etila, sendo depois submetido a análise por cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel. Duas manchas referentes a glicolipídeos foram visualizadas quando foi utilizado um sistema de solventes clorofórmio – metanol – ácido acético; outra mancha, com Rf semelhante ao conseguido com o padrão de ramnose pura, foi observada ao se aplicar outro sistema de solventes, uma mistura de propanol – hidróxido de amônio – água, indicando que foram produzidos, pelo menos, 2 diferentes tipos de ramnolipídeos neste estudo.

2.4.2. Fungos

Dentre o grande espectro de microrganismos produtores de biosurfactantes, os fungos são a categoria que apresentam o menor número de representantes.

Fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram estudados quanto a sua capacidade biodegradadora de hidrocarbonetos após serem encontrados em tanques de combustível (COOPER e ZAJIC, 1980). Foi considerado que estes microrganismos eram capazes de produzir notáveis quantidades de ácidos graxos extracelulares a partir da degradação de combustíveis.

As linhagens de *Cunninghamella elegans* e *Penicillium zonatum* foram capazes de crescer bem em substratos de óleos brutos (“Pennsylvania crude”, “West Texas Sour crude”, “Cook inlet crude”), em sistema experimental, apresentando a formação tanto de uma frágil quanto uma forte malha micelar, sendo esta diretamente determinada pela natureza do óleo utilizado (RUDD et al., 1996).

Já CARVALHO et al. (1997) analisaram o comportamento de 3 linhagens de fungos filamentosos (não identificados) quanto ao seu crescimento em meio de cultivo contendo 1,5% (v/v) de diversos hidrocarbonetos como única fonte de carbono (óleo de oliva, querosene, tolueno e vaselina). Destas, somente duas linhagens foram capazes de produzir emulsificação em testes de atividade de emulsificação e, mesmo assim, apenas quando óleo de oliva era utilizado.

2.4.3. Leveduras

Dentre os conhecidos microrganismos produtores de biosurfactantes, certas espécies de leveduras destacam-se por apresentarem altas taxas de crescimento e fácil recuperação, tanto celular quanto do biosurfactante produzido após a fermentação, quando crescidas em meio contendo hidrocarbonetos (JOHNSON et al., 1992; JACOB, 1992; SAMPAIO, 1995).

Os compostos surfactantes produzidos pelas leveduras são, especialmente, glicolipídeos extracelulares, não tóxicos, biodegradáveis, biologicamente ativos, que podem ser classificados em 4 predominantes categorias: glicosídeos de ácidos graxos hidroxilados (em *Candida bombicola* e *C. borogensis*), ésteres de ácidos graxos polióis

(em *Rhodotorula* spp.), lipídeos derivados de ácidos graxos contendo polissacarídeos (*C. tropicalis*) e lipoproteínas (*C. petrophilum*) (JACOB, 1992). Tanto o tipo de biosurfactante quanto a quantidade produzida pelos microrganismos poderão variar de acordo com alguns fatores: condições de cultivo (pH do meio, temperatura de cultivo, disponibilidade de aeração), tipo de fonte de carbono utilizada, bem como seu volume (BANAT, 1995).

CORTI et al. (1995) relataram a degradação de 4-(1-nonil)fenol, utilizado como única fonte de carbono e energia, por *Candida maltosa*, isolada de planta de tratamento de rejeitos de uma indústria têxtil. O estudo ressalta o possível envolvimento das leveduras na degradação de importantes poluentes ambientais, tais como os surfactantes químicos não iônicos, classe a qual pertencem os nonilfenóis, como o utilizado pelos autores.

CIRIGLIANO e CARMAN (1984) caracterizaram o Liposan, biosurfactante produzido pela levedura *Candida lipolytica* durante as fases finais de fermentação, em hexadecano como fonte de carbono, como um composto formado principalmente por carboidratos (83%), além de proteínas (17%). Sua extração foi realizada com uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1) e sua purificação conseguida por meio de filtrações e diálise, o que aumentou a estabilidade de emulsões de óleo vegetal em água de 10 para 50 minutos. Além disto, os autores realizaram comparações entre seu biosurfactante e outros emulsificantes comerciais, como pode ser visto na Tabela 2.3. Em outra linha de pesquisa, KITAMOTO et al. (1993) avaliaram biosurfactantes do tipo manosileritrol lipídeos, que possuem propriedades antimicrobianas e mostraram excelentes resultados de diminuição da tensão interfacial e concentração crítica micelar.

Segundo ZINJARDE et al. (1998), pesquisas têm evidenciado a eficiência de leveduras na degradação de óleos contaminantes de ambientes marinhos na Índia, principalmente, uma determinada linhagem de *Yarrowia lipolytica*, degradadora da fração alifática de petróleo.

Tabela 2.3 – Comparação das propriedades de atividade de emulsificação (U) e de estabilização^(a)

EMULSIFICANTE	ATIVIDADE (U)	ESTABILIZANTE	$K_D(10)^{(b)}$
Caragenina	1,75	Tween 80	-2,1
Tween 80	1,60	HPMC	-2,1
Tween 20	1,35	Tween 20	-2,9
Pectina	1,21	Gelatina	-3,8
Triton X-100	1,20	Alginato	-5,2
Liposan	0,75	Caragenina	-5,7
Caseína	0,65	Goma Arábica	-5,9
Alginato	0,60	Triton X-100	-5,9
Goma Arábica	0,59	Liposan	-6,0
Goma Gati	0,47	Caseína	-7,2
HPMC	0,30	Goma Gati	-7,6
Dextrana	0,22	Pectina	-8,9
Gelatina	0,08	Dextrana	-21,0

(a): a atividade de emulsificação (U) foi descrita como a quantidade de bioemulsificante que alcança a absorvância de 1,0 a 540 nm, com hexadecano como hidrocarboneto.

(b): constante de decaimento (K_D), quanto menor o valor de K_D , maior a estabilidade.

Fonte: Cirigliano e Carman (1985).

Soforolipídeos (SLs), compostos com uma molécula de soforose - parte hidrofílica - ligada a um ácido graxo por uma ou duas ligações – a parte lipofílica - vêm sendo estudados como biosurfactantes de fácil obtenção, biodegradáveis, resultantes da produção, na fase final do crescimento, de leveduras como *Candida* sp., *Torulopsis apicola*, *T. bombicola*, *T. gropengiesseri* e *T. petrophilum* (ZHOU et al., 1992; ZHOU e KOSARIC, 1995; CASAS et al., 1997). Tais biosurfactantes têm chamado a atenção científica ultimamente por possuir atividade biocida, assim como atividade anti-câncer. Além disto, os soforolipídeos estão se tornando mais atrativos comercialmente, por encontrarem aplicação em cosméticos como anticaspa, agentes bacteriostáticos desodorantes e umectantes, podendo, inclusive, agir no tratamento de doenças de pele (HU e JU, 2001). Diferentes processos de obtenção têm sido relatados, como por exemplo, a produção de altas concentrações do surfactante a partir de substratos

glicosídicos, contendo glicose, lactose, frutose ou manose e/ou compostos lipídicos como n-alcenos, óleos vegetais ou gorduras animais. Mais ainda, com a utilização de substratos de baixo custo, como soro e dejetos da indústria de laticínios (DANIEL et al., 1998). Já GARCIA – OCHOA e CASAS (1999), propuseram um modelo cinético que leva em conta as concentrações de biomassa, soforolípido e glicose. Este modelo supõe que o nitrogênio, proveniente do extrato de levedura utilizado no meio de cultura, é o fator limitante no crescimento das linhagens de levedura e a glicose, determinante tanto do crescimento quanto da produção do biosurfactante.

Autores indicam que a manoproteína extraída de *Saccharomyces cerevisiae* tem se mostrado um bioemulsificante efetivo (BARRIGA et al., 1999). O bioemulsificante extraído contém, ao menos, dois tipos de polímeros com diferentes composições químicas e propriedades emulsificantes. O estudo mostra que uma parte seria responsável pelas propriedades emulsificantes dos produtos em si, enquanto a outra aumentaria a estabilidade da emulsão, mostrando que suas habilidades em estabilizar uma emulsão seriam concentração-dependentes.

2.5. DETERMINAÇÃO DE POLUENTES INDUSTRIAIS

Diversos experimentos podem ser utilizados no sentido de se avaliar a carga poluidora de determinados efluentes. O potencial poluidor de um dado efluente urbano (industrial ou municipal) pode ser medido indiretamente por parâmetros biológicos, químicos e físicos (VON SPERLINGS, 1996), como indicadores de matéria orgânica, como a Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Biológica de Oxigênio (DBO), quantificando o conteúdo de oxigênio presente em amostras de matéria orgânica susceptíveis à oxidação por oxidante forte (GREENBERG et al., 1992) e a quantidade de oxigênio consumido por microrganismos, medidos após incubação, respectivamente. A DBO consiste num teste laboratorial para determinação de requerimentos relativos de oxigênio em efluentes, por meio da medição do consumo de oxigênio na incubação de uma dada amostra por espaço de tempo determinado, tendo grande aplicação em estações de tratamento de efluentes.

Segundo GREENBERG et al. (1992), a DBO e a DQO podem ser correlacionadas desde que sejam desenvolvidas a partir de amostras provenientes da mesma fonte. Em estações de tratamento industrial, o objetivo principal seria a redução de ambos os valores, o que indicaria uma redução da carga poluidora das amostras analisadas.

OKPOKWASILI e MOLOKWU (1996) estudaram a deterioração de óleos vegetais por leveduras e fungos, utilizando a DBO como método de medida da estabilidade dos óleos frente aos microrganismos. Os óleos de coco e de coração de palmeira ("palm kernel") foram determinados como os mais estáveis em relação à biodegradação, apresentando baixas taxas de DBO, 500 e 450mg/L, respectivamente, em comparação com os valores encontrados para os outros óleos (910 mg/L para óleo de milho, 1900 mg/L em óleo de semente de algodão, 2060 mg/L em óleo de amendoim e 2576 mg/L em óleo de palmeira).

Consórcios de bactérias foram utilizados como intuito de degradar amostras de efluente da produção de óleo de oliva na região da Tunísia, que representam uma séria fonte de poluição no Mar Mediterrâneo. Este efluente é considerado altamente tóxico, graças à presença de compostos como os do tipo tanino e produtos resultantes da acidificação e biodegradação de substâncias poliméricas, que impedem a realização de tratamentos tradicionais industriais e domésticos. Os consórcios de bactérias se mostraram capazes de reduzir a DQO inicial do efluente proveniente da produção de óleo de oliva, que chegava a alcançar 220kg/m³, em até 50 %, além de conseguirem degradar quase todos os componentes aromáticos das amostras deste efluente (ZOUARI e ELLOUZ, 1996).

Segundo DANIEL et al. (1999), o cultivo de leveduras em meio contendo soro desproteínizado, resíduo proveniente da produção de queijo, resultou na redução da DQO inicial do efluente. O tratamento em dois estágios com *Cryptococcus curvatus* e, depois, *Candida bombicula* foi efetuado com sucesso após 134 horas de crescimento, pois durante o processo de crescimento da linhagem de *C. curvatus* a redução da DQO inicial foi de 159 g/L para 35 g/L.

3. MATERIAL

3.1. MEIOS DE CULTURA

3.1.1. Meio Potato Dextrose Agar (PDA), Merck

3.1.2. Composição do meio sólido Yeast Malt Agar (YMA)

Tabela 3.1: Meio YMA

Composição	Quantidade (g/L)
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3
Peptona	5
Glicose	10
Agar	20
Água destilada	1 L

3.1.3. Composição do meio sólido meio Glucose Yeast Peptone (GYP)

Tabela 3.2: Meio GYP

Composição	Quantidade (g/L)
Glicose	20
Extrato de levedura	5
Peptona	10
Ágar	20
Água destilada	1L

3.1.4. Meio basal de sais (pH ajustado a 6,5)

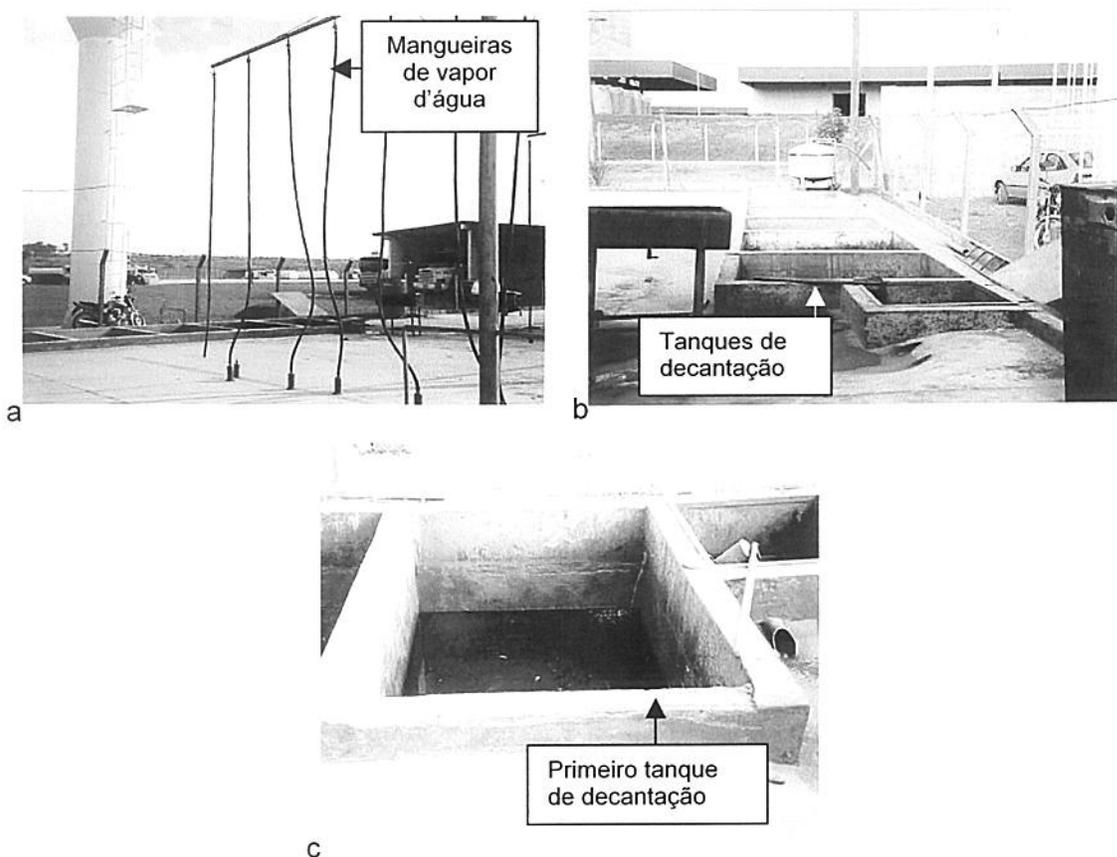
Tabela 3.3: Meio basal de sais

Composição	Quantidade (g/L)
MgSO ₄	0,5
NaNO ₃	3,0
KH ₂ PO ₄	1,0
Extrato de levedura	1,0
Peptona	0,3
Volume do efluente	100%, 75 %, 50% e 25% (v/v)
Água destilada	1L

Todos os meios utilizados foram esterilizados por meio de autoclavagem a 121°C, por 15 minutos.

3.1.5. Efluente coletado na oficina de caminhões-tanque, localizada na estrada Campinas-Paulínia, km 121, SP.

O efluente utilizado neste estudo foi coletado de uma oficina de reparos de caminhões em Paulínia/SP (Figura 3.1), e é resultado da lavagem dos tanques dos caminhões que fazem o transporte de derivados de petróleo da região. Esta limpeza com jatos de vapor d'água visa retirar qualquer resíduo de óleo diesel, óleo preto e gasolina, evitando explosões quando forem feitos os reparos por soldagem. A água da lavagem junto da parte oleosa escorre pelo solo em direção a um conjunto de tanques de decantação, onde permanece sem tratamento, apenas sofrendo sedimentação. Em alguns casos, além dos tanques de decantação existe, ao final do processo, a passagem da água através de um filtro com carbono ativado, cujo intuito seria purificar melhor esta água tratada. A borra oleosa que se acumula nos tanques é retirada periodicamente e disponibilizada a empresas que fazem a reciclagem do material para sua venda posterior.



Figuras 3.1 (a), (b) e (c): Tanques de decantação da oficina de caminhões-tanque, localizada na estrada Campinas-Paulínia, km 121, SP.

3.2. MICRORGANISMOS

As 26 linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho (Tabela 3.4) são resultado de estudos prévios do laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM) e encontram-se armazenadas na Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (LSFM), FEA/UNICAMP. Amostras de solo contaminado com óleo diesel foram coletadas de uma refinaria de petróleo em Paulínia/SP e proporcionaram o isolamento de 80 linhagens de microrganismos diferentes entre várias cepas de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Destes, algumas linhagens de leveduras foram identificadas como produtoras de biosurfactantes e foram utilizadas neste trabalho a fim de se determinar quais seriam boas produtoras de biosurfactantes. Ao final dos

experimentos de biodegradação, as linhagens de leveduras consideradas como melhores produtoras de biosurfactantes foram identificadas.

Tabela 3.4: leveduras isoladas de amostras de solo contaminado próximo à refinaria de petróleo em Paulínia, SP. ^(a)

Microrganismos	Características	Microrganismos	Características
AL1	Cultura branca	FL2	Cultura alaranjada
BL1	Cultura creme	FL2'	Células grandes e ovaladas
BL2	Cultura branca	FL3	Cultura creme
BL3	Cultura alaranjada	FL3 - rosa	Cultura rosada
BL4	Cultura alaranjada	L1C	Cultura branca, células ovaladas, sem gemulação
C1A	Cultura branca	L2A	Cultura branca, células ovaladas
C1B	Cultura preta	L3A	centro cinza e borda branca
CL1	Cultura branca	L3AL	Artrósporos, cultura filamentosa, cor creme
CL2	Cultura creme	L5A	Cultura branca, sem gemulação
CL3	Cultura alaranjada	L7A	Cultura preta
EL1	Cultura creme	L9A	Cultura branca, células grandes e ovaladas
EL3	Cultura creme	LD ^(a)	Cultura apresenta pseudomicélio
FL1	Cultura branca	Ltolu ^(a)	Isolada de tolueno

(a): cepas isoladas de outros locais

4. METODOLOGIA

4.1. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

As linhagens foram mantidas em tubos de ensaio contendo os meios de cultura GYP ou PDA, sob refrigeração a 16 °C. Estas foram transferidas para meios de cultura novos a cada 2 meses.

Também foram mantidas culturas estoque, congeladas a -18 °C, em tubos "Nunc Cryo System", contendo 1 mL de glicerol a 10 %. Para reativação, as culturas foram descongeladas, com seu conteúdo sendo transferido para Erlenmeyers de 125 mL contendo 30 mL de meio GYP líquido, sem adição de agar, sendo mantidas sob agitação em agitador rotatório (shaker) a 150 em 30 °C até crescimento satisfatório, com sua inoculação em tubos contendo meio Agar (PDA, GYP ou YMA).

4.2. COMPORTAMENTO DAS LINHAGENS CRESCIDAS EM EFLUENTE OLEOSO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

As 26 linhagens de leveduras escolhidas, isoladas de amostras de solo da oficina de caminhões na estrada Campinas-Paulínia e armazenadas no LSFM, passaram por um processo de seleção com base em seu crescimento em meio contendo o efluente da oficina de onde as amostras foram coletadas.

4.2.1. Influência da concentração da fonte de carbono

A seleção das linhagens de leveduras aptas a crescer em presença do efluente oleoso se deu sob quatro diferentes formulações desta fonte de carbono. Inicialmente, o efluente foi utilizado nas concentrações de 100 % com adição de sais minerais, 100 % sem adição de sais, 75 % e 50 % (v/v), sem passar por nenhuma esterilização, para que fosse definida a máxima concentração suportada pelas linhagens de leveduras, para seu crescimento. As composições utilizadas nesta fase inicial foram:

1. 100 % do efluente oleoso puro - as leveduras, crescidas por 48 horas em placas com meios de cultura YMA, PDA ou GYP, foram inoculadas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 70 mL do efluente não esterilizado, sem a adição de nutrientes nem ajuste de pH. Estes frascos com inóculo (5 alçadas, alça estéril de 10 µL, Alamar) foram mantidos sob agitação de 150 rpm, em agitador rotatório, por 10 dias, a 30°C. Frascos controle contendo o efluente, sem o inóculo, foram mantidos sob as mesmas condições. Em ambas as situações, os experimentos foram efetuados em duplicatas.

2. 100 % do efluente oleoso adicionado de sais – procedimento idêntico ao anterior, exceto pela adição de meio de sais indicado em 3.1.4., sem adição de água destilada estéril.

3. 75 % do efluente oleoso adicionado de sais - procedimento idêntico aos anteriores, exceto pela adição de meio de sais indicado em 3.1.4., e de água destilada estéril (25 %).

4. 50 % do efluente oleoso adicionado de sais - procedimento idêntico aos anteriores, exceto pela adição de meio de sais indicado em 3.1.4., e de água destilada estéril (50 %).

4.2.2. Influência das condições de tratamento da fonte de carbono

A seguir, partindo-se da concentração mais adequada, determinada no item anterior (4.2.1), as cepas foram testadas quanto ao crescimento, durante um período de 240 horas, em meio de sais contendo o efluente tratado sob quatro diferentes formas:

Ensaio 1 - após esterilização branda a 115 °C por 15 minutos e centrifugado a 20.000 g por 20 minutos;

Ensaio 2 – após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos, sem ser centrifugado;

Ensaio 3 - sem esterilização branda, sendo centrifugado;

Ensaio 4 - sem esterilização branda e sem centrifugação.

Esta parte do experimento teve por objetivo a verificação de possíveis variações nos resultados referentes à composição biótica do meio. Durante o restante dos experimentos o efluente foi utilizado somente sob a forma não estéril, visando a manutenção das condições ambientais da coleta.

A partir deste processo de seleção, os microrganismos que foram identificados como possíveis produtores de biosurfactantes por sua capacidade de crescimento em meio contendo, como fonte de carbono, o efluente da oficina, foram utilizados na etapa seguinte de seleção onde a determinação da atividade de emulsificação foi realizada.

4.3. PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 75 mL de meio basal de sais (item 3.1.4) acrescido do efluente a 50 % (v/v), foram inoculadas 4 alçadas (alça estéril de 10 μ L, Alamar) das culturas de leveduras, para se obter a produção dos biosurfactantes. Os frascos foram mantidos sob agitação em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 30°C e em tempos de incubação variados (1 a 6 dias), foram retirados e centrifugados por 20 minutos a 20.000 g e 25°C. Foram mantidos sob agitação, também, frascos controle, contendo a mesma concentração de efluente, sem o inóculo. Em ambas as situações, os experimentos foram executados em triplicatas.

A partir de cada frasco retirado da agitação e centrifugado foram observadas três fases diferentes: uma camada superior, constituída pelo efluente oleoso; uma camada formada pela massa celular sedimentada; e uma camada intermediária, com a fase aquosa do meio de cultura (contendo o biosurfactante). Cuidadosamente, a fase aquosa intermediária foi retirada com auxílio de pipeta automática, sendo este sobrenadante filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, visando completa eliminação do resíduo oleoso. Da mesma forma, cerca de 10 mL da fase oleosa foram retirados do centrifugado. Estes volumes foram, então, congelados para experimentos posteriores.

4.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO

Foi feito um estudo da atividade emulsificante dos compostos produzidos pelas linhagens, seguindo metodologia de COOPER e GOLDENBERG (1987), modificado por CARVALHO et al. (1996). A atividade do biosurfactante foi determinada através das emulsões formadas, tipo água em óleo ou óleo em água. A atividade foi medida determinando-se a emulsificação entre duas fases diferentes: uma correspondendo à fase hidrofóbica (tolueno) e outra, à fase hidrofílica, que é a fase aquosa do meio de cultura com o efluente da oficina previamente congelada, em que cresceu o microrganismo. As atividades de emulsificação foram determinadas depois da agitação vigorosa em agitador de tubos (Vortex) de 3,5 mL do caldo de cultura (centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos) e 2,0 mL do hidrocarboneto tolueno, acondicionados em tubo de ensaio Pyrex de 13x100 mm e 1 cm de diâmetro. Após uma hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi medida a 610 nm (A_{610}), subtraída da leitura da densidade óptica obtida antes da agitação. O resultado foi relatado como atividade de emulsificação, sendo que a unidade de emulsificação (U) é definida como a quantidade de biosurfactante capaz de elevar a absorbância do sistema em uma unidade (JOHNSON et al., 1992). Após 24 horas, a altura da coluna de material emulsificado formado na fase oleosa, devido às emulsões água em óleo, foi expressa em centímetros (COOPER & GOLDENBERG, 1987). A medição da altura (em centímetros) desta coluna formada após agitação, aliada à diferença de valores de absorbância (antes e depois da agitação em Vortex) indicou quais leveduras foram consideradas melhores produtoras de biosurfactantes, nesta fase inicial.

4.5. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DA DQO

Após a seleção inicial das linhagens produtoras de biosurfactantes (baseada nos resultados obtidos em 4.2), testes de DQO, segundo metodologia de JACOBUCCI (2000), foram utilizados como indicadores indiretos de degradação, e foram realizados como parte dos experimentos de determinação das linhagens potencialmente melhores degradadoras.

Para a determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram utilizadas as amostras oleosas centrifugadas e congeladas após o crescimento das linhagens (item 4.3). Para cada amostra de 1,0 mL de efluente acondicionado em tubo de rosca, foram adicionados 0,02 g de catalisador para DQO (Hach), 0,5 mL de dicromato de potássio 0,25 N e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, que ficaram sob refluxo por 2 horas a 150°C. Após resfriamento, 2,9 mL de água destilada foram adicionados aos tubos para que fosse realizada a leitura em espectrofotômetro Hach, modelo DR-2000 (código 440).

4.6. PRODUÇÃO DE MASSA SECA DAS LINHAGENS SELECIONADAS

Para verificar a produção de massa celular pelas linhagens selecionadas, foram inoculadas 4 alçadas (alça estéril de 10 µL, Alamar) das culturas em Erlenmeyers de 125mL, contendo 75 mL de meio basal de sais (item 3.1.4), acrescido do efluente (na concentração indicada em 4.2). Os frascos foram mantidos sob agitação no agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 30°C, sendo retirados e centrifugados, por 20 minutos a 20.000 g e 25°C, em tempos de incubação variados (de 1 a 6 dias). Foram mantidos sob agitação, também, frascos controle contendo o efluente, sem o inóculo. Em ambas as situações, os experimentos foram efetuados em triplicatas.

A massa seca foi determinada após a retirada cuidadosa da fase aquosa com pipeta automática, sendo este sobrenadante filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, visando completa eliminação de resíduo oleoso, e congelado para posteriores experimentos. Em seguida, o precipitado formado pela massa celular e a fase oleosa, contendo células em suspensão, foram lavados com o mesmo volume de hexano, transferidos para tubos de centrifuga tarados e centrifugados novamente. O novo sobrenadante, contendo solvente e óleo residual, foi descartado e o precipitado, contendo a massa celular, ressuspenso mais duas vezes em água destilada e centrifugado. A biomassa (expressa em g/L), após a segunda centrifugação, foi seca a 105°C por 24 horas e pesada, sendo, então, determinada pela diferença de pesos (modificado de KUSHIDA, 2000).

4.7. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE pH

O pH das amostras das leveduras inicialmente selecionadas foi determinado diretamente, utilizando-se potenciômetro modelo TEC – 2, Tecnal.

4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO BIOSURFACTANTE

Após ser realizada a seleção das linhagens potencialmente identificadas como melhores degradadoras, testes de determinação da atividade dos biosurfactantes foram executados, através da determinação dos valores de tensão superficial, complementando os resultados obtidos dos testes de atividade de emulsificação e de DQO. Com base no conjunto de resultados destes testes realizados, determinou-se a posterior produção dos biosurfactantes e sua extração para caracterização parcial.

Através de medição das tensões superficiais dos sobrenadantes, com o uso de um tensiômetro digital Krüss, modelo K 10 T, pelo método de anel de duNoüy, foi definida a capacidade de redução da tensão superficial proporcionada pelos biosurfactantes de cada levedura selecionada. Para tanto, foi tomado um volume de 20 mL da fase aquosa obtida após crescimento de cada linhagem, previamente separada (item 4.3). Este material foi descongelado e mantido a 20 °C em banho-maria. A seguir foram feitas medidas da tensão superficial com tensiômetro com anel de platina acoplado, das triplicatas de cada amostra e de seu controle.

4.9. PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

Para se realizar a caracterização parcial dos biosurfactantes sintetizados pelas cepas selecionadas foi necessária a produção dos biosurfactantes em maior escala, para posterior extração, a fim de se determinar seu rendimento e possível composição, possivelmente influenciados pela concentração da fonte de carbono, o efluente oleoso da oficina.

Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL do meio de sais, pH 6.5 , descrito no item 3.1.4, contendo o efluente oleoso em duas diferentes concentrações (25% e 50%, v/v) foram mantidos sob agitação em agitador mecânico a 150 rpm com temperatura de 30 °C, por 5 dias, depois de serem inoculados com as linhagens selecionadas utilizando 1 alçada (alça estéril de 10 µL, Alamar) para cada 50 mL de meio. Os frascos foram retirados e centrifugados por 20 minutos a 20.000 g e 25°C, separando-se inicialmente a fase aquosa com pipeta automática e congelando-a para posterior análise de atividade de emulsificação (item 4.4) e determinação de sua atividade biosurfactante, pela medição da tensão superficial (item 4.8). A parte oleosa foi igualmente retirada e congelada para posterior determinação da DQO (item 4.5).

Diferentes métodos de extração foram realizados com o intuito de se obter os melhores rendimentos possíveis, conforme item 4.9.3. Glicolípídeos, por exemplo, podem ser extraídos da massa celular (quando ligados à parede celular) ou, então, do sobrenadante (quando são extracelulares) utilizando-se diferentes solventes (como acetato de etila, éter ou clorofórmio/metanol) que, ao serem evaporados, liberam extrato contendo o biosurfactante (FALATKO & NOVAK, 1992) que pode ser purificado por cristalização (HU & JU, 2001), coluna cromatográfica (ZINJARDE et al., 1998; PALITTAPONGARNPIM et al., 1998) ou cromatografia de camada delgada (TLC) (BANAT et al., 1991; DANIEL et al., 1998). Biosurfactantes com boa solubilidade em água, também podem ser obtidos do sobrenadante por sua precipitação por abaixamento de pH e temperatura (segundo KUSHIDA, 2000).

4.9.1. Influência da concentração da fonte de carbono na análise dos biosurfactantes produzidos

Para a produção e extração dos biosurfactantes das cepas selecionadas foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL do meio de sais descrito no item 3.1.4. O efluente foi adicionado ao meio em duas diferentes concentrações, 25 % e 50 % (v/v). Este ensaio procurou observar o comportamento das linhagens selecionadas frente às diferenças de concentrações empregadas.

4.9.2. Influência da concentração da fonte de carbono sobre a Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para determinação da variação da DQO foi utilizada metodologia descrita no item 4.5, aplicada a cada uma das linhagens selecionadas na fase inicial, levando-se em conta a variação na concentração da fonte de carbono utilizada sob duas formas (25 % e 50 %, v/v).

4.9.3. Extração dos biosurfactantes produzidos

Para cada uma das cepas selecionadas foram realizados três tipos diferentes de extração (item 4.9), segundo metodologia de KUSHIDA (2000), a fim de se determinar o melhor método de extração, conforme o rendimento e atividade de emulsificação obtidos (item 4.4), nas duas concentrações finais do efluente (25% e 50%).

Extração por acidificação – foi adicionado HCl 37 % à fase aquosa, separada após produção (item 4.9), até atingir pH 2,0, determinado por potenciômetro. Em seguida, este substrato foi deixado em repouso por 24 horas a 4 °C, com o intuito de se obter um precipitado.

Este substrato foi então centrifugado a 20.000g por 20 minutos e 25 °C, em frascos previamente tarados. O sobrenadante foi cuidadosamente separado e o precipitado congelado para posterior liofilização a -80 °C, por 24 horas. Após a liofilização, foi feita sua pesagem para obtenção do rendimento conseguido e acondicionamento em dessecador para análises posteriores.

Extração com clorofórmio - metanol (2:1:3)– a fase aquosa descongelada, obtida depois de sua produção (item 4.9), foi transferida para um funil de separação no qual foi adicionado clorofórmio. Agitou-se vigorosamente por 5 minutos e adicionou-se metanol à mistura. Novamente foi agitado por 5 minutos e deixado em repouso para separação de fases. A proporção utilizada foi clorofórmio – metanol – fase aquosa (2:1:3).

A fase inferior, correspondendo ao clorofórmio misturado ao biosurfactante, foi coletada em frasco tarado e evaporada em rotoevaporador. O extrato obtido foi congelado para posterior liofilização a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, e pesagem para cálculo do rendimento. Posteriores análises de emulsificação foram realizadas com o liofilizado que foi mantido em dessecador.

Extração com clorofórmio (2:1) – esta extração foi realizada conforme extração anterior (clorofórmio – metanol), excetuando-se a adição de metanol.

4.10. ANÁLISE DOS BIOSURFACTANTES EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

Foi feita uma análise parcial da composição dos biosurfactantes por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de sílica gel G, após a extração e liofilização dos biosurfactantes, seguindo metodologia de KUSHIDA (2000). Isto permitiu que a CCD fosse usada tanto na separação de substâncias hidrofóbicas, como de hidrofílicas, com o intuito de melhor definir a composição dos biosurfactantes sintetizados.

Os extratos liofilizados de cada linhagem foram dissolvidos em clorofórmio (concentração de 15 mg/mL) e metanol (concentração de 25 mg/mL) e aplicados, segundo metodologia de KUSHIDA (2000), cerca de 10 μL , em placas de sílica gel G. Foram utilizados como padrões óleo de oliva, óleo de soja, uma mistura de aminoácidos (arginina, prolina, lisina, alanina, glicina, fenilalanina e histidina, 20 mg/mL) e uma mistura de açúcares (glicose e sacarose, 20mg/mL). Como sistema de solventes foi utilizado clorofórmio – metanol (4:1) adicionado de piridina 2 % e água destilada 2 % e as manchas foram visualizadas por borrifamento das placas com os reagentes rodamina 6G, ninidrina e azul de molibdênio, como descrito por DITTMER e LESTER (1964).

A visualização foi conseguida por:

- I) Borrifamento de rodamina 6 G (0,005 % em água destilada) seguido de visualização sob lâmpada UV, para detecção de lipídeos;
- II) Borrifamento de ninidrina (0,2 % em acetona) na placa seca, seguido de visualização após aquecimento a 100 °C, para detecção de aminogrupos livres;
- III) Borrifamento de reagente azul de molibdênio (Sigma), para detecção de ésteres de fosfato e açúcares.

Os reveladores foram aplicados nas placas de cada uma das linhagens nesta ordem, para se obter o máximo de informações a partir de uma mesma placa.

4.11. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS SELECIONADAS

No sentido de se identificar as espécies de leveduras selecionadas como melhores produtoras de biosurfactantes foram realizados estudos morfológicos, coloniais e individuais, em microscópio óptico.

Complementando estes estudos, análises de respostas fisiológicas foram realizadas por meio de testes bioquímicos (testes de crescimento e fermentativos) padronizados pelo Sistema de Identificação de Leveduras API 20 C Aux, a fim de confirmar os estudos morfológicos e auxiliar na identificação das espécies de leveduras. Como características fisiológicas importantes para a identificação, utilizam-se as propriedades de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, fatores de crescimento, síntese de determinados metabólitos, entre outras. O Sistema se caracteriza por possuir 20 microtubos contendo substâncias desidratadas para o desenvolvimento de 19 testes de assimilação, com o inóculo das linhagens de interesse. As reações de crescimento diferenciado foram interpretadas por meio do software Apilab.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE LEVEDURAS POR MEIO DE DIFERENTES FATORES DETERMINANTES

5.1.1. Influência da concentração da fonte de carbono e composição do meio basal no crescimento das linhagens

As 26 linhagens de leveduras escolhidas foram analisadas visualmente quanto a sua capacidade de crescimento em diferentes concentrações do efluente oleoso não estéril, a fim de se averiguar qual seria a máxima concentração da fonte de carbono em que seria possível o crescimento das linhagens, procurando-se simular ao máximo as condições ambientais do local da coleta.

Como resultado destes processos de crescimento sob a influência da fonte de carbono (Tabela 5.1), foi identificado o crescimento de praticamente todas as linhagens somente quando a concentração do efluente alcançou um valor de 50 % do meio de cultura, adicionado de sais. Crescimentos em concentrações maiores que esta não foram considerados satisfatórios mesmo quando foram adicionados sais complementares e extrato de levedura ao meio, pois, dentre as 26 linhagens iniciais, somente 3 foram capazes de crescer em meio contendo 75 % do efluente.

A partir deste processo de determinação inicial da concentração do efluente a ser utilizada, os microrganismos considerados possíveis produtores de biosurfactantes (por sua capacidade de crescimento em meio contendo, como fonte de carbono, o efluente da oficina a 50 %) passaram para a etapa seguinte, de crescimento em diferentes ensaios (indicados no item 3.1.5), para logo após se efetuar a determinação da atividade de emulsificação, bem como a determinação dos valores de DQO.

Tabela 5.1: Resultado do experimento de crescimento em meio contendo efluente oleoso sob diferentes concentrações

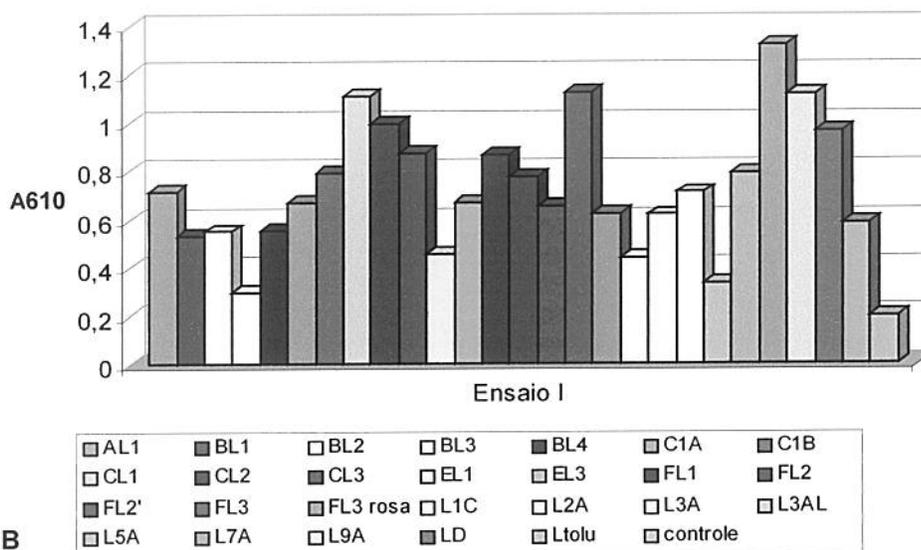
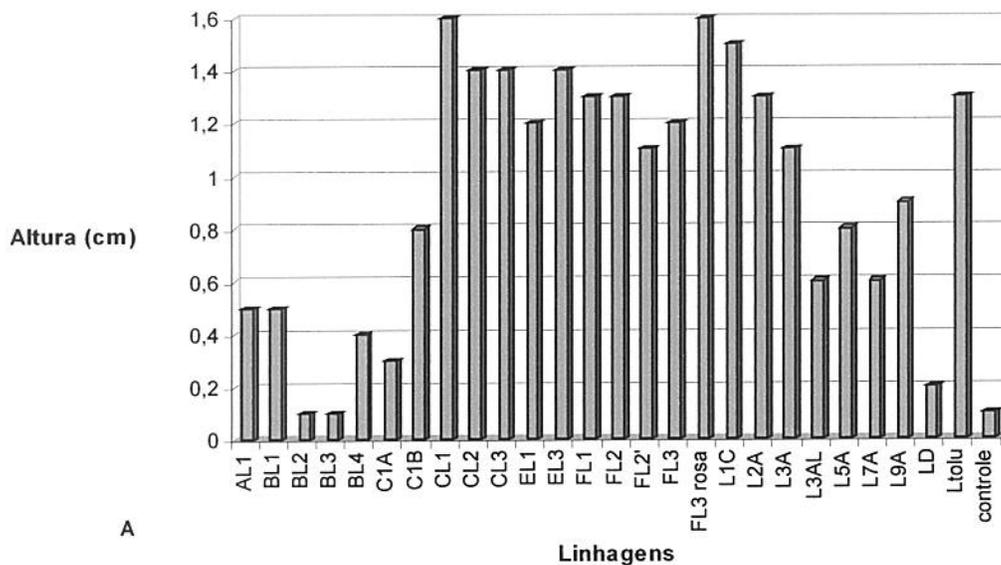
CONCENTRAÇÕES	CRESCIMENTO DAS LINHAGENS	CARACTERÍSTICAS DO CULTIVO
1	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento
2	Ausência de crescimento	Ausência de crescimento
3	Todas as linhagens, exceto AL1, BL1, BL3, BL4, C1B, EL3 e FL2	Meios contendo pouca quantidade de massa celular ao fundo
4	Todas as linhagens, exceto BL3, BL4, EL3 e FL2	Meios contendo pouca quantidade de massa celular ao fundo

1. 100 % do efluente oleoso puro
2. 100 % do efluente oleoso adicionado de sais
3. 75 % do efluente oleoso adicionado de sais
4. 50 % do efluente oleoso adicionado de sais

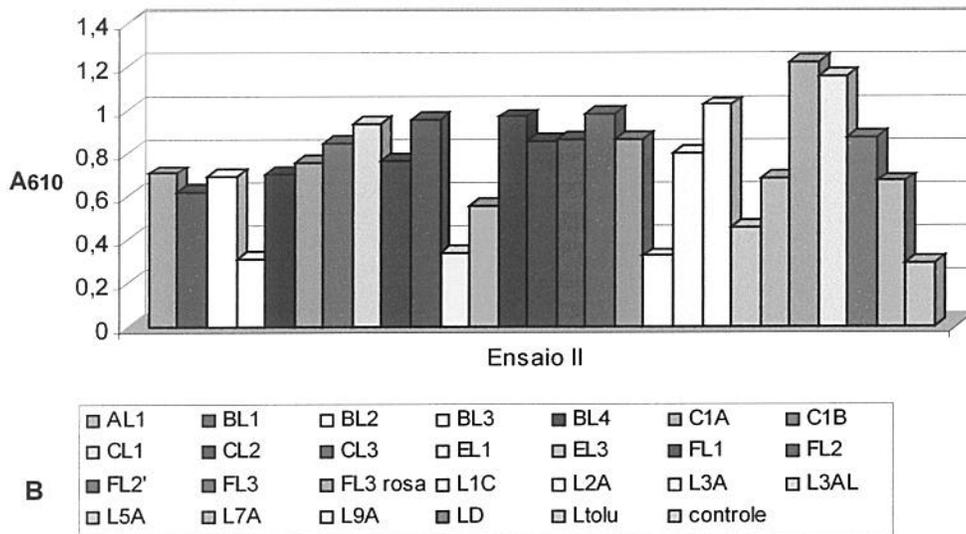
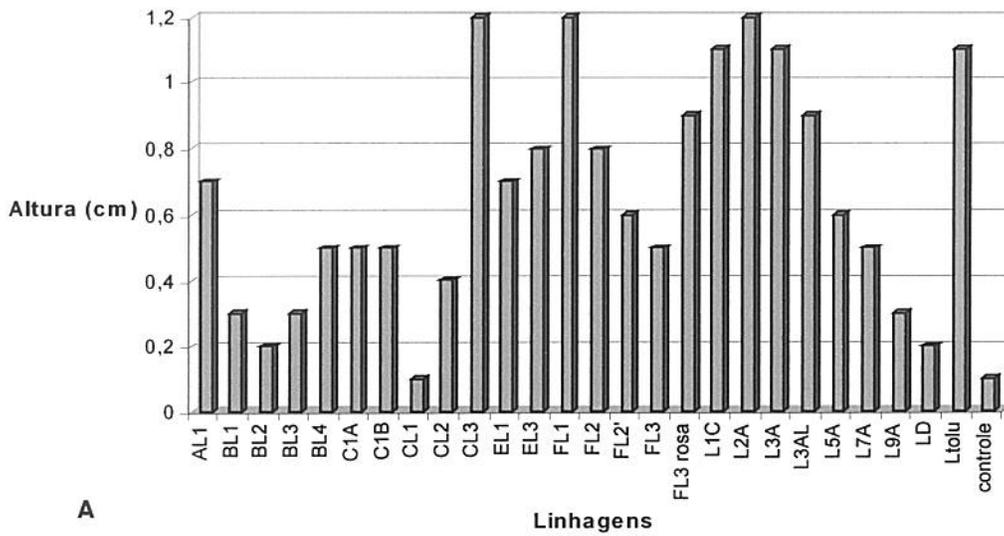
5.1.2. Determinação da atividade de emulsificação

Após o crescimento das linhagens em meio basal de sais com a concentração do efluente determinada (50%, v/v), foram desenvolvidos testes de emulsificação com a fase aquosa previamente separada e congelada.

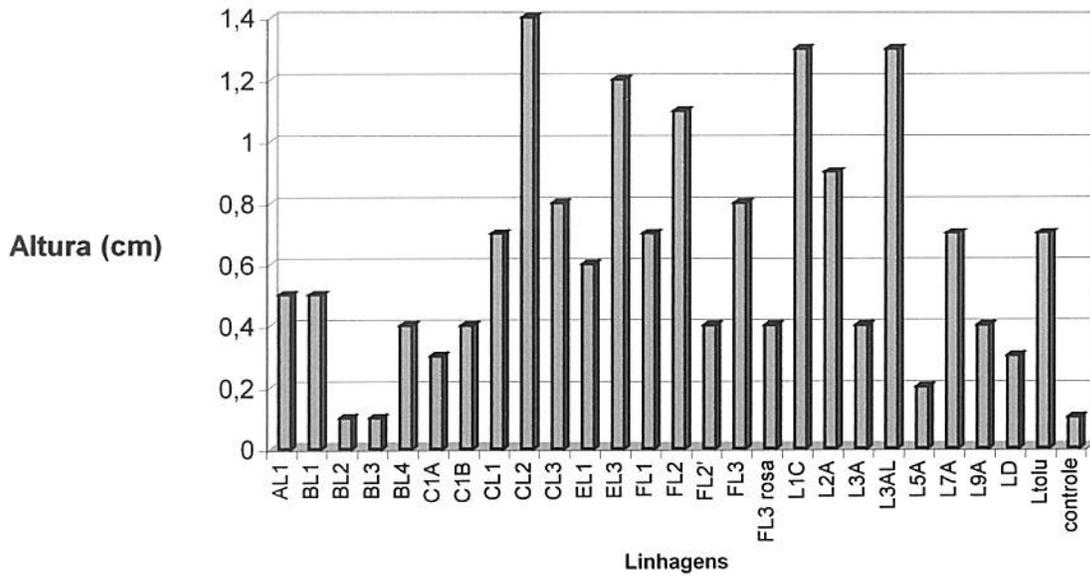
Algumas linhagens apresentaram valores de atividade de emulsificação bastante significativos, com os resultados sendo visualizados nas Figuras 5.1 (a) e (b): para o Ensaio 1, Figuras 5.2 (a) e (b): para o Ensaio 2, Figuras 5.3 (a) e (b): para o Ensaio 3, Figuras 5.4 (a) e (b): para o Ensaio 4 e Apêndice 1. Estes ensaios apontaram como resultados as medidas de altura dos halos formados (em emulsões do tipo água em óleo), bem como os valores de absorbância (emulsões óleo em água) .



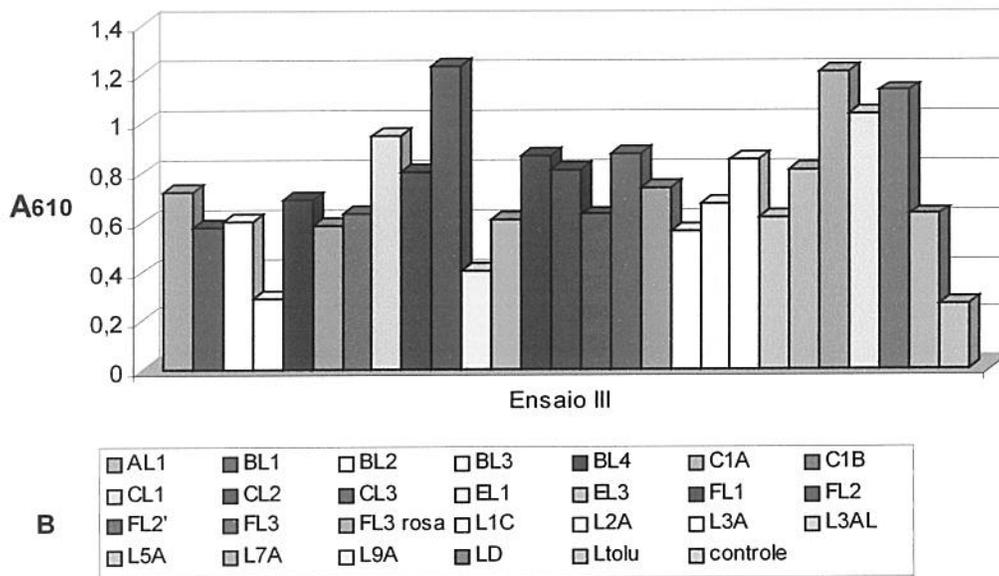
Figuras 5.1 A e B: Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 1 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos e centrifugado a 20.000 g por 20 minutos). **(A)** Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e **(B)** Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 1.



Figuras 5.2 A e B: Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 2 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos sem ser centrifugado) **(A)** Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e **(B)** Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 2.

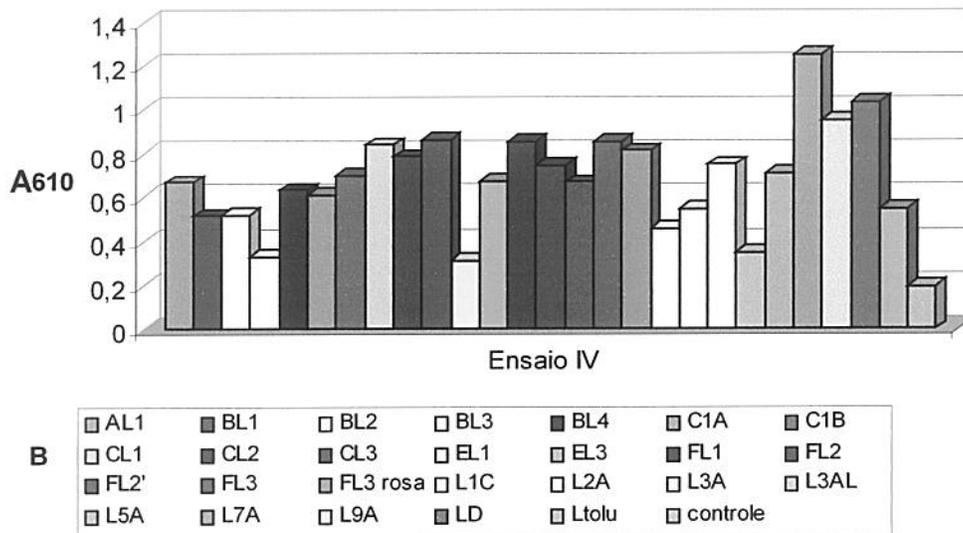
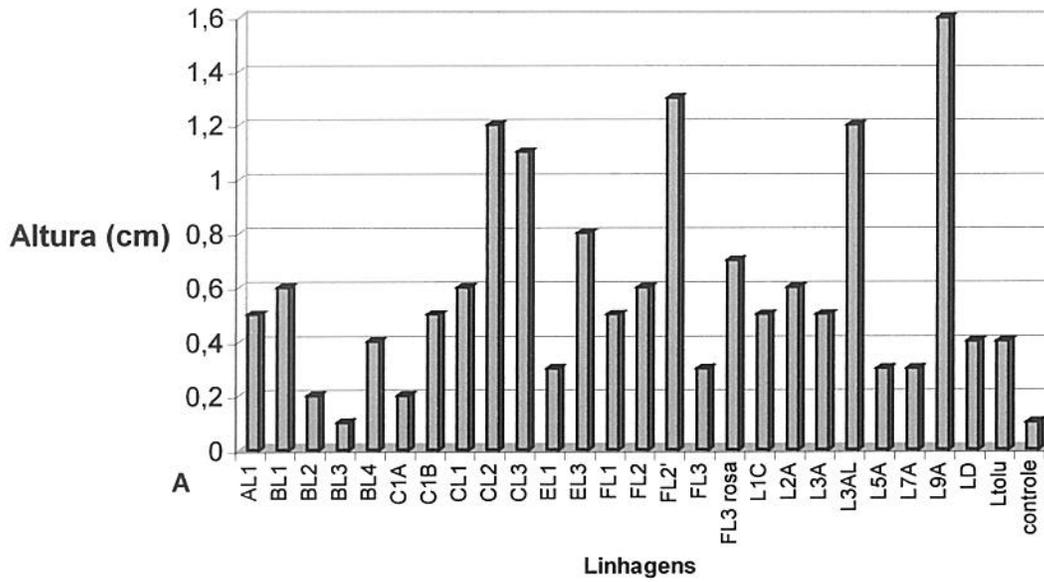


A



B

Figuras 5.3 A e B: Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 3 (sem esterilização, sendo centrifugado). **(A)** Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e **(B)** Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 3.



Figuras 5.4 A e B: Atividade de emulsificação após crescimento das linhagens de leveduras durante Ensaio 4 (sem esterilização, sem centrifugação). **(A)** Variação da altura das colunas de emulsificação (emulsão água-óleo) e **(B)** Absorbância (emulsão óleo-água), após Ensaio 4.

Quando analisados os dados referentes à atividade emulsificante foram observadas colunas de emulsificação máximas de 1,6 cm para a cepa L9A, no Ensaio 3, e absorvâncias muito próximas de 1,0 para as 3 linhagens, L7A, L9A e LD, nos quatro ensaios diferentes indicando aceitáveis condições das cepas em emulsificar um composto hidrofóbico como o tolueno. Como pode ser observado, tais valores de atividade emulsificante discordam sensivelmente daqueles obtidos por CARVALHO et al. (1997, 1998), que utilizaram em seus experimentos as linhagens L9A, L7A, mostrando que em meio contendo tolueno e vaselina como fontes de carbono, respectivamente, foram encontrados valores de altura da coluna de emulsificação e absorvância semelhantes; cerca de 2,3 cm em 120 horas, para L9A e uma absorvância de cerca de 1,4 (U/L) para a L7A. Pode-se justificar a diferença nos valores conseguidos nesta tese quando levado em conta as condições modificadas que foram aplicadas como, por exemplo, a constituição da fonte de carbono e, inclusive, uma concentração bastante superior do que aquela encontrada em literatura, o que pode interferir em muito na produção e composição dos biosurfactantes obtidos, como sugere BANAT (1995).

Já, com a utilização do mesmo efluente oleoso proveniente da oficina em experimentos com linhagens de bactérias (*Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*), não foi detectada atividade de emulsificação, sendo apontados como possíveis problemas a presença de compostos inibidores do crescimento ou, então, uma alta concentração de hidrocarbonetos, hipóteses que não devem ser descartadas, uma vez que não se pode afirmar com certeza a real composição do efluente utilizado (JACOBUCCI, 2000).

O processo seletivo das linhagens de leveduras melhor capacitadas para o processo de biodegradação dos compostos oleosos utilizados foi realizado com sucesso, visto que foi conseguida a seleção de 3 linhagens dentre as 26 que foram cultivadas no início dos experimentos.

As linhagens L7A, L9A e LD, se destacaram por apresentar características determinantes para a produção de biosurfactantes sendo capazes de promover tanto a

emulsificação de compostos hidrofóbicos quanto reduzir significativamente os valores de DQO apresentados pelo efluente antes dos tratamentos.

Pelos dados apresentados, nota-se que enquanto no Ensaio 1 foram obtidos os melhores resultados tanto em absorvância quanto em medidas de colunas formadas, o Ensaio 4 evidenciou uma forte influência da composição do meio, inibindo o desenvolvimento de melhores resultados quanto à atividade de emulsificação. Contudo, o efluente do Ensaio 4 foi escolhido para ser utilizado nos demais estudos de produção de biosurfactantes (pelas linhagens L7A, L9A e LD), a fim de se manter as características mais semelhantes ao ambiente de onde foi recolhido o efluente utilizado.

5.1.3. Determinação da remoção da DQO

Além dos testes de emulsificação, foram efetuados testes para se determinar a remoção da DQO na fase oleosa dos meios de cultura com 10 dias de crescimento, coletados por centrifugação. Ao fim dos 10 dias de crescimento, testes de DQO foram realizados a fim de se obter valores de variação das quantidades de oxigênio da amostra, susceptível à oxidação, indicando uma possível degradação do efluente oleoso por meio do biotratamento com as leveduras utilizadas. Os resultados destes testes podem ser visualizados nas Figuras 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 e Apêndices 2 e 3.

As Figuras 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 evidenciam os resultados obtidos em relação à porcentagem de degradação alcançada pelos microrganismos durante os 4 processos de biotratamento. No Apêndice 2 estão relatados os valores de DQO encontrados em cada ensaio de degradação, enquanto que no Apêndice 3 foram descritas as porcentagens gerais dos ensaios 1,2,3 e 4.

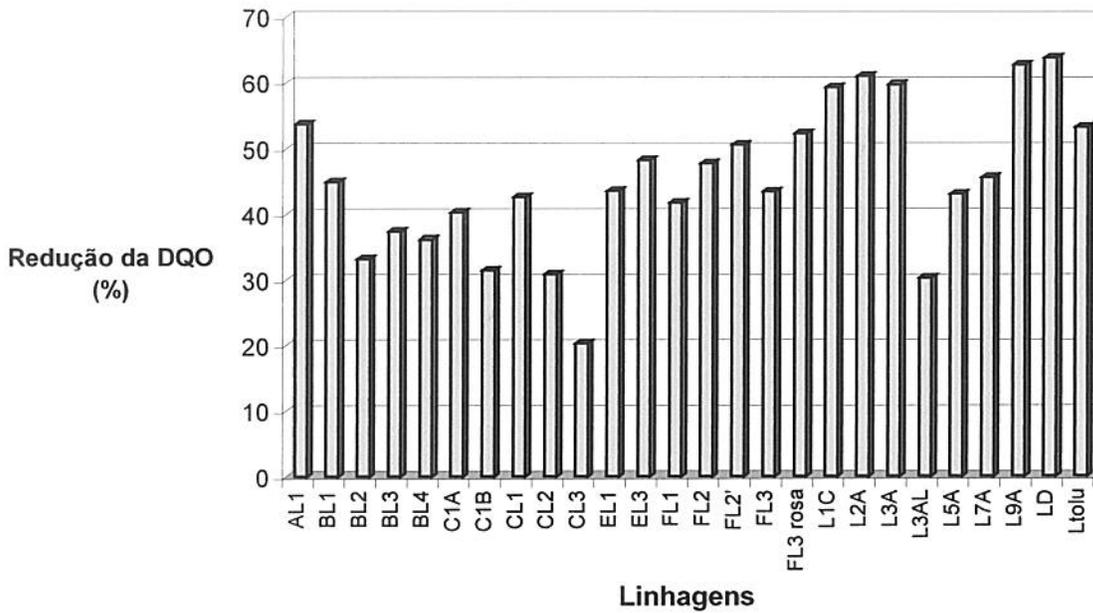


Figura 5.5: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 1 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos e centrifugado a 20.000 g por 20 minutos)

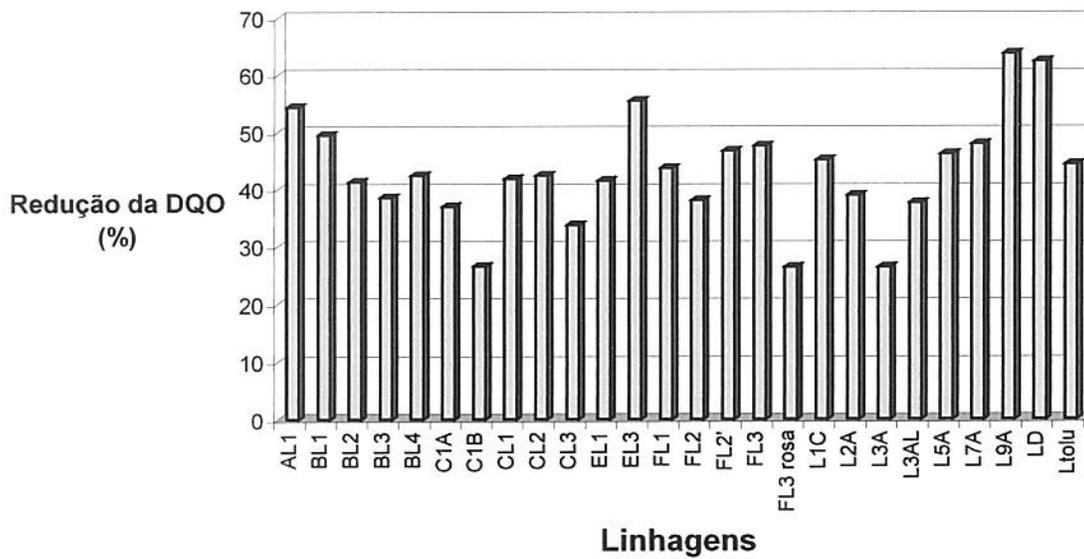


Figura 5.6: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 2 (após esterilização branda, a 115 °C por 15 minutos sem ser centrifugado).

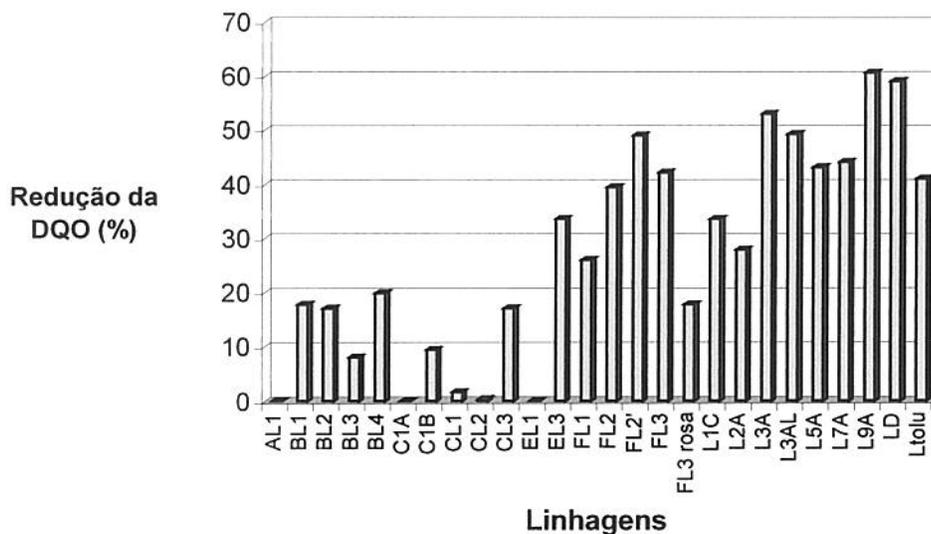


Figura 5.7: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 3 (sem esterilização, sendo centrifugado).

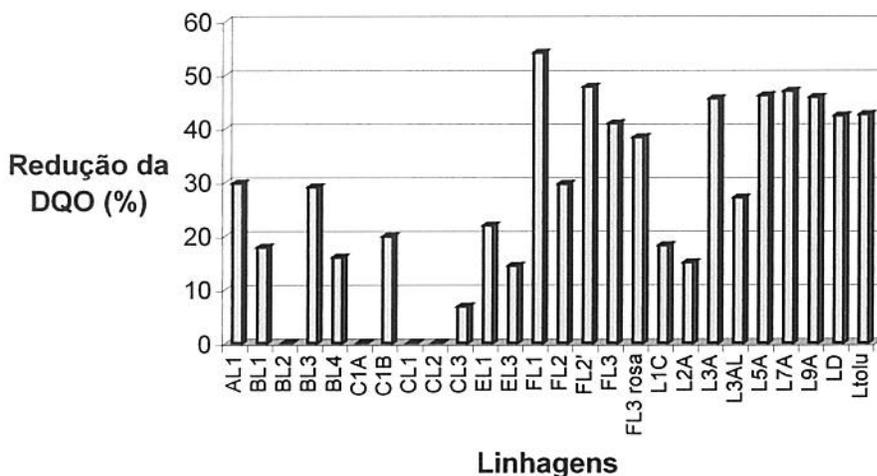


Figura 5.8: Redução da Demanda Química de Oxigênio (%) para o Ensaio 4 (sem esterilização, sem centrifugação).

JACOBUCCI (2000), encontrou como valor de DQO para o efluente proveniente da oficina, 5500 mg/L, antes de passar por biotratamentos. A diferença de valores entre tal estudo e este se dá, provavelmente em relação à composição original do efluente, uma vez que este é formado pela

borra oleosa proveniente da lavagem dos caminhões – tanque. Como não existe controle sobre quais os compostos irão fazer parte de sua composição, este efluente é completamente dependente do fornecimento de material em um dado período de tempo. Além disto, outro fator que pode causar variação na composição do efluente seria o clima durante o período de coleta do efluente, pois maiores exposições ao sol e temperatura do solo mais elevados ocasionariam uma maior evaporação do efluente nos tanques, tornando o efluente bem mais concentrado.

JACOBUCCI (2000), obteve para este efluente uma redução máxima de 57,45%, em 24 horas, em um ensaio realizado com consórcio de biosurfactantes extraídos de culturas das bactérias *Planococcus citreus* e *Pantoea agglomerans*. Durante estes experimentos foi encontrado um valor de 5500 mg/L de DQO para o controle, inferior ao observado neste projeto, como por exemplo, o valor mínimo definido de 5956 mg/L, definido no Ensaio 1, com o efluente centrifugado e esterilizado, que alcançou uma redução da DQO de cerca de 70 % com as linhagens L5A, L7A e L9A.

Nos ensaios 3 e 4, nos quais o efluente não foi esterilizado, o controle alcançou valores de 6329 e 6716 mg/L, e após tratamento com L9A com seus níveis de DQO chegando a 2497 e 2671mg/L, respectivamente, representando uma redução de DQO de cerca de 60 % em 10 dias de crescimento. Mais ainda, pode-se notar que as linhagens L5A, L7A e L9A e LD sempre mantiveram uma boa taxa da DQO, podendo indicar boa produção de biosurfactantes disponibilizando melhor o composto oleoso para adsorção e acondicionamento das microgotas de óleo dentro da célula ou, então, degradação pelas células após captação do composto.

ZOUARI e ELLOUZ (1996) relataram ter conseguido, por meio de degradação aeróbia com consórcio de bactérias, a remoção de 50 % da demanda química de oxigênio inicial de amostras de efluentes da produção de óleo de oliva. Neste caso, as culturas foram deixadas para crescer por 2 semanas. Já DANIEL *et al.* (1998), conseguiram uma redução da DQO de cerca de 78 % com linhagem da levedura *Cryptococcus curvatus*, cultivada em meio contendo soro de leite como fonte de carbono. Originalmente, o valor de DQO do efluente puro era de 159 g/L, caindo para 35 g/L após o biotratamento com a cepa de levedura.

Assim, justifica-se a redução encontrada, pelo tempo de incubação proposto de 240 horas, pois, além da possibilidade de ação das leveduras utilizando o efluente como fonte de carbono, deve-se levar em consideração o tempo de incubação das amostras, bem como as condições de

cultivo propostas, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C, que poderiam acelerar a degradação dos compostos. Mesmo assim, pode-se considerar que as linhagens L7A, L9A e LD se destacaram frente às outras linhagens, proporcionando tanto redução considerável da DQO quanto atividade emulsificante significativa.

5.2. PRODUÇÃO DE MASSA SECA DAS LINHAGENS SELECIONADAS

Com base nos resultados dos experimentos três linhagens foram selecionadas (L7A, L9A e LD) como boas produtoras de biosurfactantes e por serem capazes de reduzir DQO. A partir desta seleção inicial, novos testes foram realizados a fim de se aprimorar o estudo dos biosurfactantes produzidos por estas leveduras isoladas de solo.

Desta maneira, foi realizado mais um processo de crescimento das 3 linhagens selecionadas, contudo, somente durante 144 horas (item 4.6), retirando-se amostras das linhagens e dos controles a cada 24 horas. Depois de centrifugadas e separadas as fases oleosa e aquosa, experimentos para determinar a biomassa formada durante o crescimento foram realizados.

Os resultados obtidos para cada uma das 3 linhagens selecionadas indicam um aumento da biomassa a partir de 48 horas para a linhagem L7A e a partir de 72 horas para as linhagens L9A e LD. Também podem ser observadas na Figura 5.9, quedas na concentração celular da linhagem L9A nas primeiras 24 horas e em 72 horas, podendo justificar tal resultado certa incapacidade inicial da linhagem em se adaptar ao meio contendo efluente altamente seletivo, ocasionando uma queda na concentração celular. Uma segunda queda na concentração celular desta mesma linhagem em 72 horas, poderia ser explicada por uma falha experimental (deficiência na lavagem/secagem das amostras ou variação de temperatura e agitação do agitador rotatório durante o crescimento, por exemplo) ou, então, pela presença de biosurfactantes no inóculo inicial utilizado, facilitando a disponibilização dos compostos oleosos às células durante as primeiras horas de adaptação, que seriam armazenados dentro das mesmas, sem que houvesse um aumento na concentração celular do meio. Já para as linhagens L7A e LD observa-se a queda da concentração celular em 48 horas, podendo indicar uma sensibilidade inicial das linhagens em relação ao efluente oleoso, com possível ação inibitória no meio.

Embora houvesse queda na produção de biomassa nas primeiras horas, as 3 cepas foram capazes de recuperar o crescimento, chegando a um máximo por volta de 96 horas, para L7A, e 120 horas, para LD e L9A.

Estes resultados podem ser considerados satisfatórios quando comparados aos dados encontrados na literatura em relação às mais diversas linhagens de leveduras crescidas em presença de outros nutrientes, como por exemplo, diferentes de fonte de carbono (ZHOU *et al.*, 1993; ZHOU e KOSARIC, 1995; SAMPAIO, 1995; DANIEL *et al.*, 1998). Sampaio (1995) obteve uma máxima produção de massa seca (6,3g/L, em até 72 horas) ao cultivar *Saccharomyces lipolytica* em óleo diesel a 5 %. ZHOU *et al.* (1993) alcançaram cerca de 140 g/L de biomassa em 144 horas, com o cultivo de *Torulopsis bombicula* em presença de óleo de girassol, enquanto que ZHOU e KOSARIC (1995) obtiveram em 168 horas, 150 g/L de biomassa de *Candida bombicula* em óleo de canola.

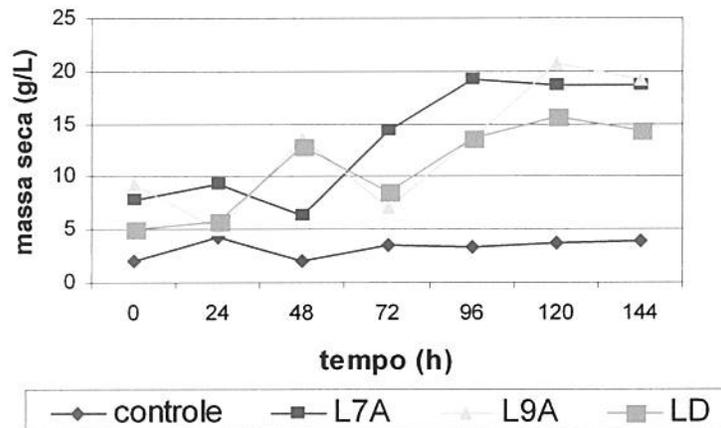


Figura 5.9: Biomassa produzida após crescimento das linhagens por 144 horas.

Neste caso, as leveduras selecionadas neste estudo, apesar de apresentarem crescimento inferior à maioria dos cultivos tradicionais, possuem o diferencial de serem capazes de crescer em meio altamente seletivo, tanto por sua composição quanto por sua concentração.

5.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE EMULSIFICAÇÃO DAS LINHAGENS SELECIONADAS

As Figuras 5.10 e 5.11 mostram os resultados das atividades de emulsificação obtidas com os crescimentos das linhagens L7A, L9A e LD.

Comparando-se estes resultados com aqueles obtidos no item 5.1.2 durante o Ensaio 4 (durante 240 horas de crescimento), as atividades de emulsificação das linhagens neste novo experimento se mostraram ligeiramente diferentes. Tal fato poderia ser explicado pela diferença de condições de cultivo, pois a complexa mistura de hidrocarbonetos presente no efluente da oficina poderia garantir uma degradação incompleta e seletiva, iniciada pelo consumo dos hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis, restando hidrocarbonetos de maior dificuldade de degradação ao fim das 144 horas de cultivo. Outra hipótese para tal fato, que não exclui a primeira explicação, é que ao serem cultivadas em menor tempo, as linhagens não disporiam de tempo suficiente para a obtenção de maiores quantidades de biosurfactantes dispersos no meio de cultura, inibindo o processo de degradação e, por conseqüência, se refletindo nos resultados dos testes de emulsificação.

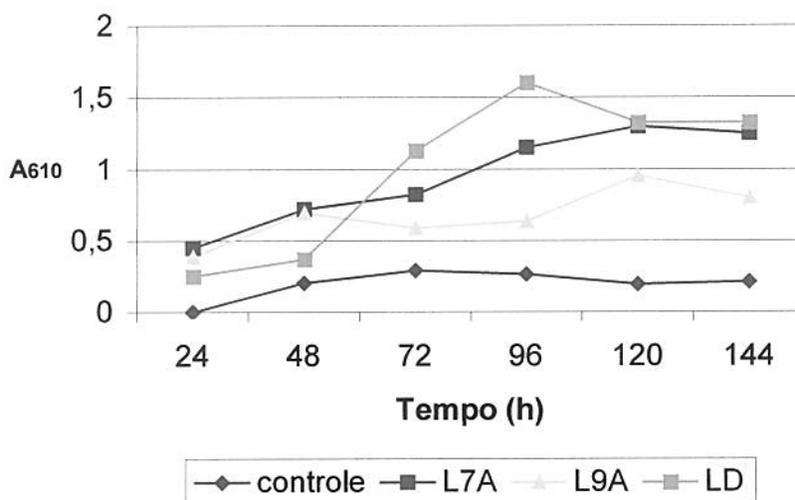


Figura 5.10: Variação da Absorbância (A_{610}) das linhagens selecionadas, ao longo de 144 horas.

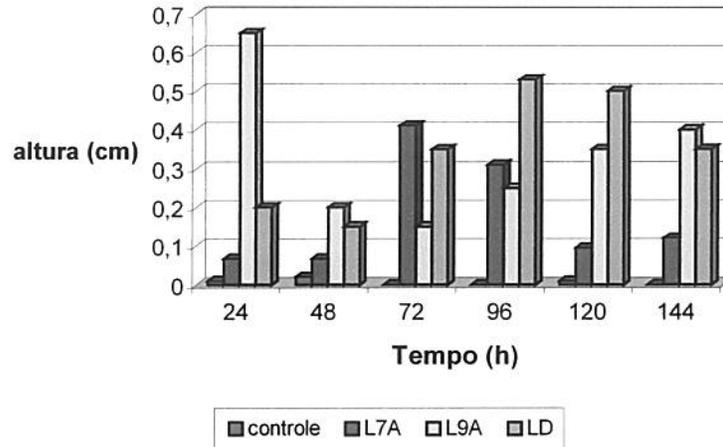


Figura 5.11: Variação da altura das colunas de emulsificação formadas pela emulsificação das linhagens selecionadas, ao longo de 144 horas.

CARVALHO et al. (1997, 1998) encontraram valor de absorvância para a levedura L7A igual a 1,4, em 48 horas de cultivo em vaselina e emulsificação com tolueno, enquanto que neste trabalho, o maior valor de absorvância para esta mesma levedura foi de 1,2 em 120 horas de cultivo. Pode-se concluir com isto que a linhagem em questão consegue se desenvolver no efluente da oficina, contudo tal crescimento não se iguala ao conseguido quando crescida em meio contendo vaselina ou, mesmo óleo de oliva, em menor tempo de cultivo.

Os valores das medidas das colunas de emulsificação se mantiveram por volta de 0,4 a 0,6 cm, para L7A e L9A, com um valor máximo para L7A em 72 horas e, 24 horas para L9A. Neste caso, uma possível hipótese seria uma adaptação da levedura L9A ao novo meio, com produção de determinada quantidade de biosurfactante inicialmente, sendo este rapidamente consumido, em seguida, a fim de facilitar o crescimento da L9A no meio contendo o efluente oleoso. Enquanto isso, LD apresentou medidas de até 1,3 cm, em 96 horas de crescimento, mostrando, igualmente, propensão à síntese de biosurfactante capaz de promover emulsões do tipo água em óleo.

Os valores de atividade de emulsificação se encontram menores que os relatados em outros estudos, levando a crer que talvez estas medições apresentassem melhores resultados quando utilizadas fontes de carbono de fácil utilização ou, então, em menor concentração, o que as tornaria mais disponíveis aos microrganismos. SAMPAIO (1995) relaciona o comportamento instável de atividade emulsificante, com oscilações e picos em diferentes tempos de fermentação, ao fato de haver passos metabólicos inerentes aos microrganismos, onde determinadas frações

dos hidrocarbonetos seriam preferencialmente degradadas por se apresentarem mais disponíveis, como as n-parafinas, em detrimento de outras, com maior dificuldade de degradação, como frações aromáticas.

5.4. VARIAÇÃO DO pH DO MEIO CULTIVADO COM AS LINHAGENS SELECIONADAS

Partindo de um pH inicial de aproximadamente 6,0, apresentado pelo meio contendo o efluente da oficina, pode-se notar uma manutenção do pH dos meios de cultura por volta de 6,5 até 7,5, mantendo-se dentro da neutralidade, como pode ser observado pelos resultados ilustrados na Figura 5.13. Esta situação é bastante propícia ao crescimento dos microrganismos, que são dependentes da estabilidade do meio para alcançar boas taxas de crescimento e desenvolvimento fisiológico.

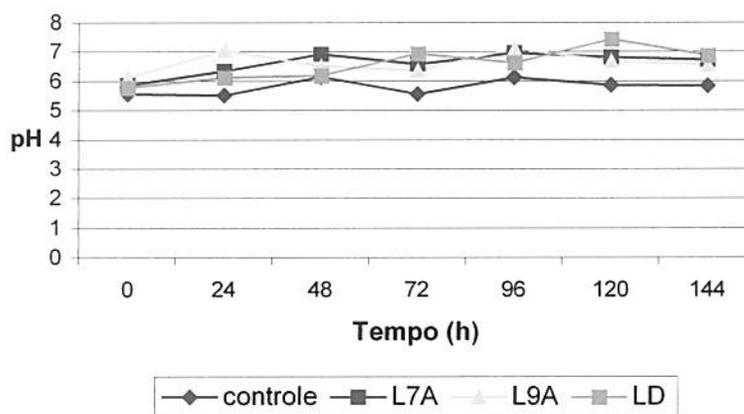


Figura 5.12 : Variação do pH das linhagens selecionadas ao longo de 144 horas.

SAMPAIO (1995) trabalhando com a degradação de óleo diesel por *Saccharomyces lipolytica*, encontrou valores de crescimento melhores ao utilizar pH 5,0 e 4,5 do que quando comparado ao crescimento obtido em pH mais baixo (4,0). O autor testou o crescimento da levedura em diferentes valores de pH, contudo valores mais ácidos inibiram de certa forma o crescimento das leveduras.

5.5. PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

Segundo os dados obtidos nos itens 5.1, 5.2 e 5.3, as linhagens LD e L7A foram novamente selecionadas por apresentarem melhores resultados, tanto na produção de massa celular quanto em eficiência dos biosurfactantes produzidos e redução de DQO.

Partindo-se deste fato, para se realizar a caracterização parcial dos biosurfactantes sintetizados pelas cepas selecionadas foi necessária a produção dos biosurfactantes em maior escala em período de tempo de cultivo determinado pelos melhores resultados conseguidos, para posterior extração, a fim de se definir seu rendimento e possíveis composições, possivelmente influenciados pela concentração da fonte de carbono, o efluente oleoso da oficina.

5.5.1. Influência da concentração da fonte de carbono

Ao serem realizados experimentos variando-se a concentração da fonte de carbono para cada uma das linhagens a fim de se avaliar a influência desta variação, foram percebidas pequenas diferenças nos resultados obtidos. Estes dados podem ser observados nas Figuras 5.13, 5.14, 5.15 e 5.16.

Igualmente aos resultados apresentados no item 5.4, o pH dos meios de cultivo manteve-se próximo da neutralidade, tanto para a levedura LD quanto para a linhagem L7A. No caso da linhagem LD, com dados mostrados na Figura 5.13, em ambas as concentrações utilizadas o meio apresentou pH semelhante e próximo de 6,5. Já com a linhagem L7A, os valores de pH mostraram pequena variação.

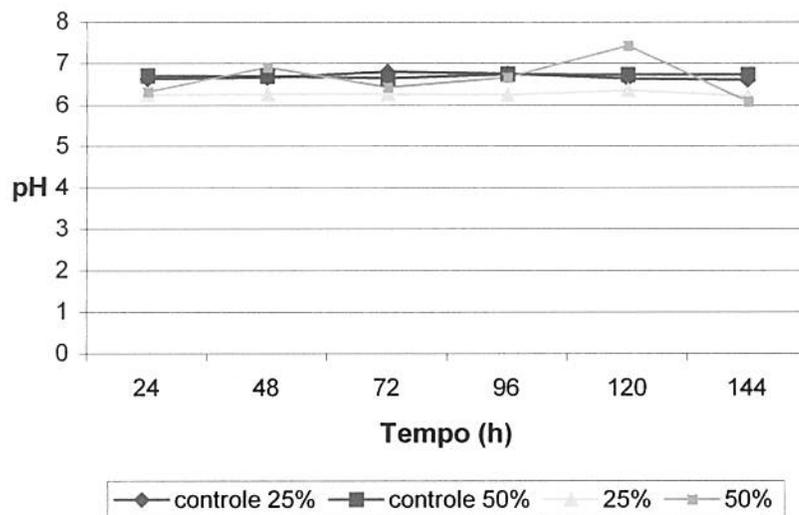


Figura 5.13: Variação do pH para a linhagem LD em diferentes concentrações da fonte de carbono

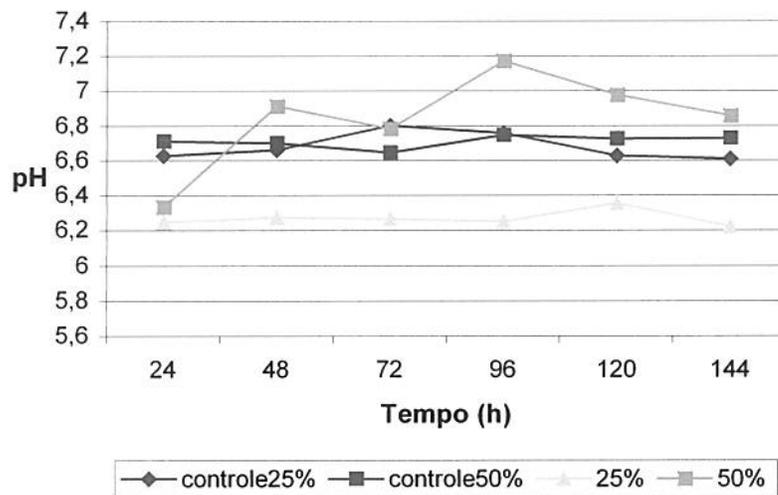


Figura 5.14: Variação do pH para a linhagem L7A em diferentes concentrações da fonte de carbono

Em relação à atividade emulsificante, como apresentado nos resultados já indicados nos itens 5.1 a 5.3, as leveduras LD e L7A produziram biosurfactantes necessários à emulsificação de

tolueno em fase aquosa derivada do cultivo das linhagens. Os resultados, observados na Figura 5.15, indicam uma resposta mais rápida, em 72 horas, e melhor da linhagem L7A com o cultivo em meio contendo o efluente a 25%, quando comparadas as colunas de emulsificação formadas em emulsões água em óleo com o cultivo em 50%, para a mesma linhagem, enquanto que bons valores de absorbância foram conseguidos com 120 horas de cultivo nas 2 concentrações da fonte de carbono. Por outro lado, a linhagem LD apresentou melhores resultados em emulsões do tipo óleo em água, com absorbância chegando a 1,6 no cultivo em 25% do efluente, em 96 horas e 120 horas, em 50%. A absorbância para esta linhagem alcançou níveis máximos em 120 horas de crescimento sob as 2 concentrações. Estes resultados podem ser visualizados nas Figuras 5.15, 5.16 e 5.17.

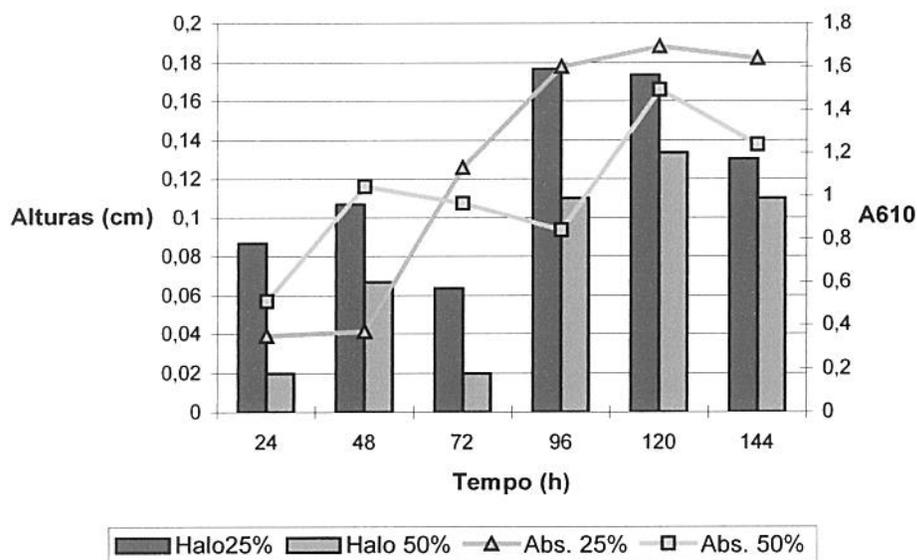


Figura 5.15: Atividade de emulsificação da linhagem LD em diferentes concentrações da fonte de carbono

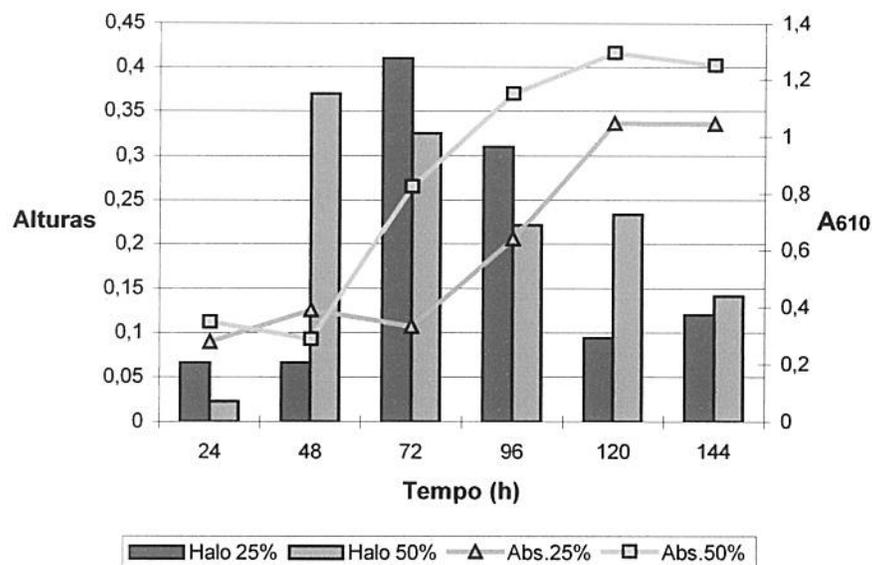


Figura 5.16: Atividade de emulsificação da linhagem L7A em diferentes concentrações da fonte de carbono

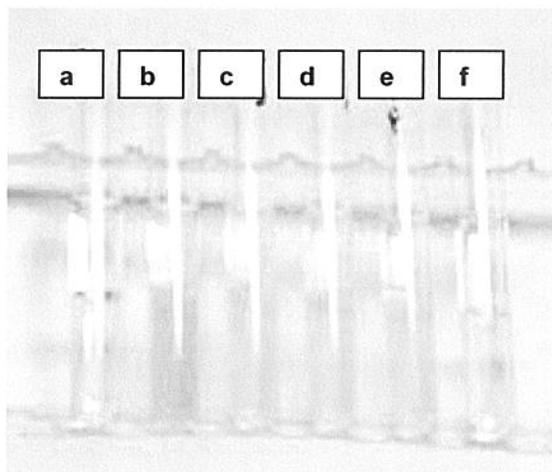


Figura 5.17: Resultados de testes de emulsão com a fase aquosa dos meios de cultivo, após 120 horas. (a) controle abiótico com efluente a 25%, (b) LD a 25%, (c) LD a 50%, (d) L7A a 25%, (e) L7A a 50% e (f) controle abiótico com efluente a 50%

Outro fator determinante da eficiência dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens foi a variação da tensão superficial, obtida por medição em tensiômetro pelo método de anel. A linhagem LD apresentou valores de tensão superficial iguais a 38, 0 mN/m em 72 horas e

36,5mN/m num período de 48 horas, para biosurfactantes produzidos pela cepa sob concentrações do efluente a 25% e 50%, respectivamente. Estes dados podem ser visualizados na Figura 5.18.

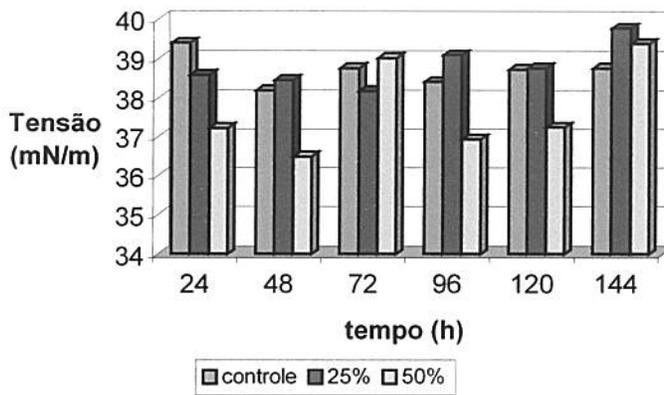


Figura 5.18: Tensão superficial pelo biosurfactante da linhagem LD

Para a linhagem L7A os valores mínimos de tensão superficial foram alcançados em 144 horas de cultivo, para ambas as concentrações de 25 e 50% da fonte de carbono, mostrados na Figura 5.19. Para a concentração de 25%, 31,2 mN/m foram conseguidos enquanto que para a concentração de 50%, 31,02 mN/m foram alcançados, mostrando valores bastante significativos em matéria de redução da tensão superficial, quando comparados com os controles.

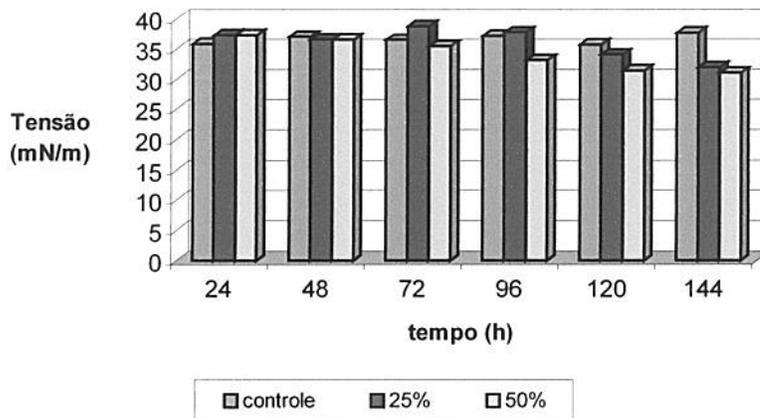


Figura 5.19: Variação da tensão superficial pelo biosurfactante da linhagem L7A

ZHOU e KOSARIC (1995), indicaram que soforolípídeos produzidos por *Candida bombicula* foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 33 mN/m. BANAT *et al.* (1991) mostraram que o biosurfactante produzido por uma linhagem de bactéria isolada de uma petroquímica foi capaz de reduzir a tensão superficial até 33.2 mN/m em 30 horas de cultivo. Valores de 45 mN/m e 35 mN/m foram conseguidos com o cultivo por 240 horas de microrganismos em meio contendo gasolina e glicose/óleo, respectivamente, por FALATKO e NOVAK (1992). Já Kitamoto *et al.* (1993) relataram a produção de manosileritritol com tensão superficial de até 28.2 mN/m, resultante do cultivo de *Candida antarctica*.

5.5.2. Influência da concentração da fonte de carbono na remoção da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Comparando-se os dados apresentados no item 5.1.3 e aqueles obtidos com 120 horas de tratamento, observados na Figura 5.20 e nos Apêndices 2, 3 e 5, percebe-se uma nítida diferença nos valores de redução da DQO. Enquanto, em 240 horas de tratamento, eram encontrados valores de quase 50 % na redução da DQO, em 120 horas, a linhagem L7A foi capaz de reduzi-la em até 13,3%.

Já a linhagem LD não apresentou redução na DQO do efluente, em 120 horas de tratamento, apresentando valores maiores (6876mg/L com concentração do efluente a 25% e 7650mg/L, a 50%) do que aqueles encontrados no controle (6740 mg/L do controle com efluente a 25% e 6620 mg/L em controle, a 50%). Uma explicação possível para tal fato se daria com base na complexa composição do efluente utilizado, uma mistura de vários hidrocarbonetos, que incidiria numa maior dificuldade de degradação por parte das linhagens. A degradação de muitos hidrocarbonetos pesados e complexos, como aqueles de alto peso molecular, cicloalcanos de múltiplos anéis e aromáticos polinucleados ainda não foi adequadamente desvendada, segundo SAMPAIO (2000), sabendo-se somente que a degradação de compostos como as n-parafinas é preferencial, em comparação com outras, de maior dificuldade de degradação, como frações aromáticas. Portanto, taxas indiretas de degradação, como a DQO, mais baixas em menor tempo de tratamento poderiam indicar uma utilização inicial dos biosurfactantes produzidos na degradação de hidrocarbonetos de assimilação simplificada, ocasionando uma queda na concentração destes surfactantes biológicos. Com isto, a degradação de hidrocarbonetos mais complexos poderia ser realizada por cooxidação, onde hidrocarbonetos recalcitrantes seriam quebrados em assimilação a outros utilizados para o crescimento do microrganismo. Ou, então, como uma segunda hipótese,

esta degradação seria retardada até que a biota fosse novamente capaz de sintetizar mais biosurfactantes, sendo, assim, capaz de solubilizar tais compostos a fim de fazer sua captação e deterioração.

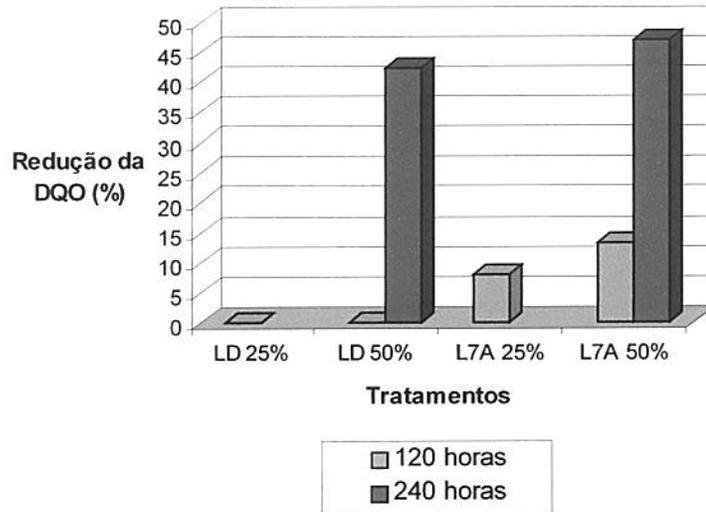


Figura 5.20: Redução da Demanda Química de Oxigênio em diferentes tempos de tratamento e concentração.

5.5.3. Extração dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens LD e L7A

Para identificar qual a melhor maneira de se isolar os biosurfactantes produzidos, 3 diferentes métodos de extração foram realizados (item 4.9.3), segundo KUSHIDA (2000), a fim de se determinar o melhor rendimento obtido e atividade de emulsificação (item 4.7). Os resultados destas metodologias se encontram na Figura 5.21.

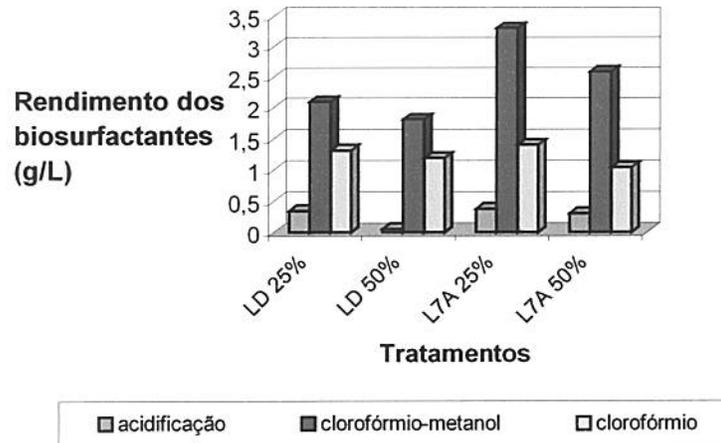


Figura 5.21: Comparação entre as diferentes extrações para as linhagens LD e L7A

5.5.3.1. Extração por acidificação

Ao se tentar extrair os biosurfactantes por acidificação com HCl 37%, conforme item 4.9.3, uma quantidade muito pequena de precipitado foi formada, resultando em baixo rendimento, para todos os 4 tratamentos diferentes, observado na Figura 5.21. Com isto, ficou evidenciado que tal extração foi ineficiente em relação a ambas as linhagens, pois além de obtenção de rendimento muito baixo, os extratos liofilizados não produziram resultados em testes de emulsificação, após sua diluição em água destilada, como observado nas Figuras 5.21 e 5.22.

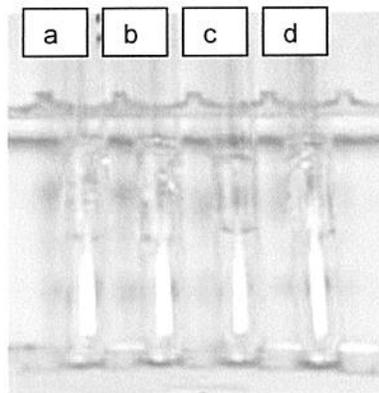


Figura 5.22: Testes de emulsificação com biosurfactante obtido por acidificação. (a) linhagem LD com efluente a 25%, (b) LD a 50%, (c) L7A a 25% e (d) L7A a 50%.

Para a diluição dos liofilizados de LD a 25% e 50% do efluente, foram adicionados 0,0012g e 0,0002g a 3,5 mL de água destilada, respectivamente, agitados em Vortex. A seguir foram realizados testes de emulsificação segundo o item 4.4.

5.5.3.2. Extração com clorofórmio (2:1)

Foram obtidos rendimentos de biosurfactantes iguais a 1,31g/L e 1,19g/L para a linhagem LD quando crescida, em 120 horas, em presença de efluente oleoso nas concentrações de 25% e 50%. Estes rendimentos podem ser considerados intermediários, quando comparados àqueles obtidos nas outras metodologias de extração para a mesma linhagem (por acidificação e com clorofórmio-metanol). Para a linhagem L7A foram conseguidos 1,4g/L em meio contendo a fonte de carbono a 25% e 1,04g/L em meio com 50% do efluente.

Com a solubilização dos liofilizados, o biosurfactante de L7A mostrou possuir melhores características emulsificantes que o de LD, tanto em concentração menor de efluente quanto maior, podendo ser visualizado na Tabela 5.2 e nas Figuras 5.21 e 5.22.

5.5.3.3. Extração com clorofórmio - metanol (2:1:3)

Na extração com clorofórmio e metanol foram obtidos rendimentos de 2,09 g/L e 1,8g/L para o biosurfactante produzido pela linhagem LD, em presença da fonte de carbono a 25% e 50%, respectivamente. Para a linhagem L7A foram conseguidos rendimentos de 3,31g/L e 2,58g/L para as duas diferentes concentrações do efluente, 25% e 50%. Comparando-se o rendimento obtido, a absorvância e as alturas das colunas de emulsificação apresentadas após os testes de emulsificação, esta extração se destacou como a melhor metodologia para as duas linhagens de leveduras, como pode ser averiguado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Testes de emulsificação dos biosurfactantes das linhagens LD e L7A.

Tratamentos	Absorvância			Colunas de emulsificação (cm)		
	Acidificação	Cl.- Met. ^(a)	Clorofórmio	Acidificação	Cl.- Met. ^(a)	Clorofórmio
LD 25%	0	0,899	0,805	0	0,2	0,3
LD 50%	0	0,717	0,58	0	0,1	0,2
L7A 25%	0	0,988	0,802	0	0,1	0,1
L7A 50%	0	0,748	0,68	0	0,1	0,2

(a)Cl.- Met.: clorofórmio – metanol

Os biosurfactantes extraídos apresentaram coloração clara, na forma de um líquido amarelado, que foi liofilizado em um pó muito fino, como pode ser observado nas Figuras 5.23 e 5.24. Uma segunda extração não resultou em quantidade significativa de extrato, suficiente para armazenamento. Os biosurfactantes de LD produzidos em meios com fonte de carbono a 25 e 50%, foram diluídos (item 4.10), para posterior teste de emulsificação, nas concentrações de 0,0073g e 0,0063g em 3,5 mL de água destilada. Para os biosurfactantes da linhagem L7A, 0,0116g e 0,0049g dos liofilizados foram dissolvidos para o teste de emulsificação.

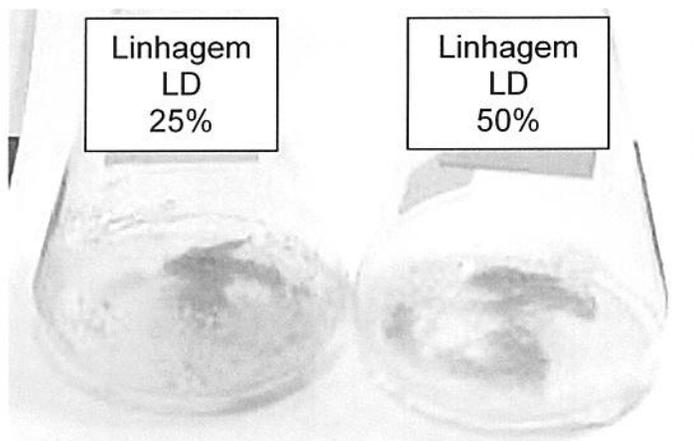


Figura 5.23: Biosurfactantes da linhagem LD liofilizados após extração com clorofórmio-metanol.

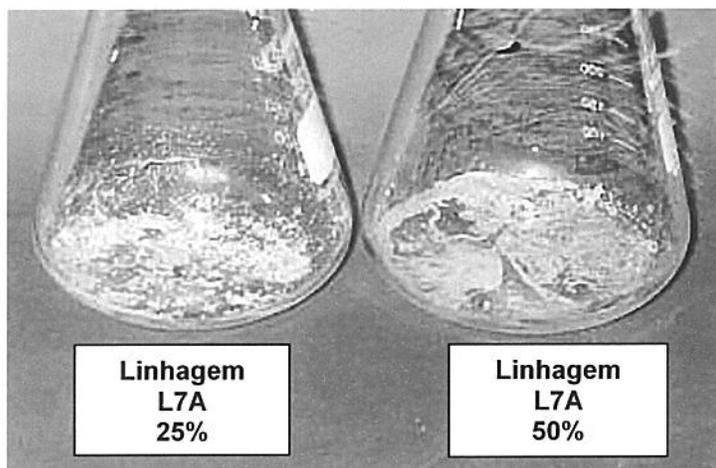


Figura 5.24: Biosurfactantes da linhagem L7A liofilizados após extração com clorofórmio-metanol.

5.6. Análise dos biosurfactantes em Cromatografia de Camada Delgada

Ao ser borrifada com Rodamina 0,005% a placa de sílica gel G que continha amostras do biosurfactante produzido pela levedura LD apresentou três manchas referentes aos padrões de lipídeos, duas manchas para os extratos de 25% (dissolvidos em clorofórmio e metanol) e uma mancha para o extrato de 50% (em clorofórmio). A placa referente à linhagem L7A, ao ser borrifada com o mesmo reagente detector universal de lipídeos, mostrou sob luz UV, as manchas dos padrões de lipídeos, além de mais três manchas, sendo duas referentes à de concentração 25% da fonte de carbono, diluídas em clorofórmio e uma a 50%, igualmente diluída neste solvente. Quando Ninidrina 0,2% foi borrifada nas placas, além do padrão de aminoácidos, foram identificadas três manchas na placa da linhagem LD, todas dissolvidas em metanol, sendo uma para a concentração de 25% e duas na de 50%. Ao ser borrifada por Ninidrina e seca a 100 °C, a placa da linhagem L7A mostrou, além do padrão, mais cinco pequenas manchas, duas da amostra de 25% e duas outras de 50%, diluídas em metanol, mais uma da diluição em clorofórmio da amostra de 50%. Por fim, ao se borrifar o reagente azul de molibdênio (Sigma) na placa de LD, foram evidenciadas duas manchas em amostra de 50%, uma em clorofórmio e outra, metanol, mais uma para a amostra de 25% em clorofórmio. Nenhuma mancha foi observada na placa de L7A, após borrifamento com este reagente.

As placas das duas linhagens foram esquematizadas nas Figuras 5.27 e 5.28. Como valores de Rf na Cromatografia em Camada Delgada da linhagem LD foram obtidos: (1)=0,68, (2)=0,25, (3)=0,74, (4)=0,07, (5)=origem, (6)=0,91, (7)=0,4, (8)=0,16, (9)=0,075, (10)=0,05, (11)=origem, (12)=0,1, (13)=0,14, (14)=0,72, (15)=0,74. Para a linhagem L7A os valores de Rf foram: (1)=0,24, (2)=0,08, (3)=0,075, (4)=0,042, (5)=origem, (6)=0,53, (7)=0,058, (8)=0,075, (9)=0,058, (10)=origem, (11)=origem, (12)=0,14, (13)=0,89, (14)=0,83.

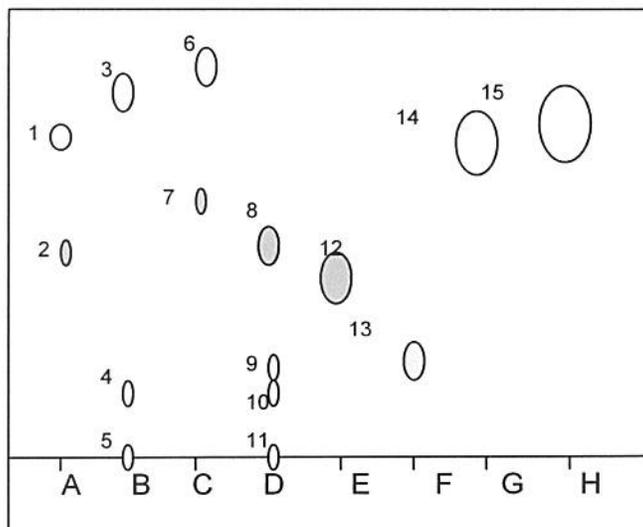


Figura 5.25: Perfil da cromatografia em camada delgada do biosurfactante produzido pela linhagem LD. A = LD 25%-clorof., B=LD 25%-metanol, C = LD 50%-clorof., D = LD 50%-metanol, E = padrões de açúcares, F = padrões de aminoácidos, G = óleo de soja, H = óleo de oliva. Rodamina 6G = manchas em amarelo. Ninidrina = manchas em rosa. Azul de molibdênio = manchas em azul.

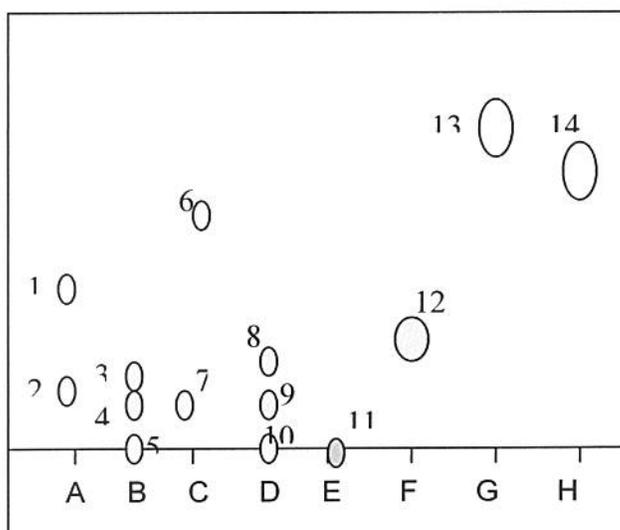


Figura 5.26: Perfil da cromatografia em camada delgada do biosurfactante produzido pela linhagem L7A. A = L7A 25%-clorof., B=L7A 25%-metanol, C = L7A 50%-clorof., D = L7A 50%-metanol, E = padrões de açúcares, F = padrões de aminoácidos, G = óleo de soja, H = óleo de oliva. Rodamina 6G = manchas em amarelo. Ninidrina = manchas em rosa. Azul de molibdênio = manchas em azul.

5.7. Identificação das leveduras selecionadas

Para se identificar as duas espécies de leveduras selecionadas como melhores produtoras de biosurfactantes, estudos morfológicos, tanto das unidades formadoras de colônias (UFC) quanto individuais (celulares), foram realizados, em complemento aos testes bioquímicos padronizados (testes de crescimento e fermentativos) pelo Sistema de Identificação de Leveduras API 20 C Aux.

A linhagem L7A (Fig. 5.27a) foi identificada como *Cryptococcus laurentii*, após analisado seu comportamento frente aos 19 testes de assimilação metabólica do API 20 C Aux, com seus resultados sendo computados através do Apilab, relatando as reações de crescimento diferenciado que foram interpretadas por meio do software. Por outro lado, como a levedura LD (Fig. 5.27b) já havia sido identificada em estudos anteriores do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, coube a este estudo somente confirmar os resultados, identificando tal linhagem como *Geotrichum terrestre*.

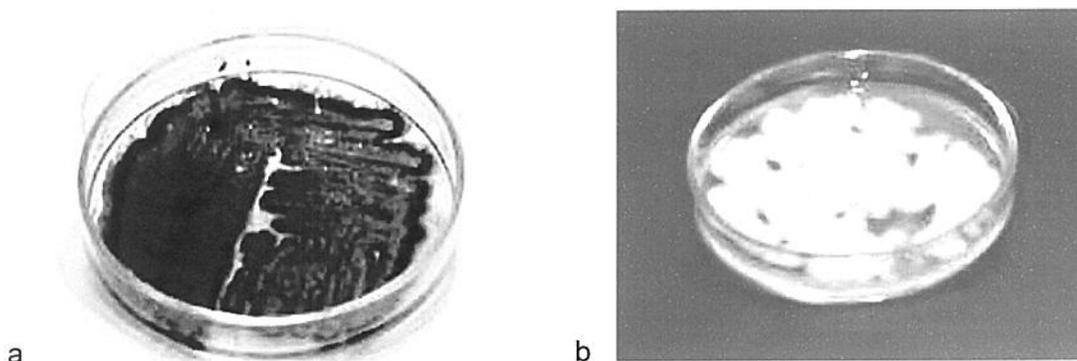


Figura 5.27: Linhagens de leveduras selecionadas, crescidas em meio sólido. (a) Linhagem L7A crescida em meio PDA, por 48 horas; (b) Linhagem LD crescida em meio GYP, por 48 horas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das 26 linhagens de leveduras escolhidas inicialmente, L7A, L9A e LD se destacaram quanto ao seu crescimento e produção de biosurfactantes, frente a concentrações máximas do efluente em meio basal de sais, procurando se manter as condições ambientais do local da coleta. Desta forma, quando analisados os dados referentes à atividade emulsificante encontrada são observadas colunas de emulsificação (emulsão do tipo água em óleo) máximas de 1,6 cm para a cepa L9A e absorbâncias (emulsão óleo em água) sempre muito próximas de 1,0 para as 3 linhagens, indicando a tendência dos biosurfactantes produzidos pelas cepas de emulsificar um composto hidrofóbico como o tolueno. As medidas das colunas de emulsificação formadas se mantiveram entre 0,4 e 0,6 cm, para L7A e L9A, com um registro máximo para L7A em 72 horas e, 24 horas para L9A. Neste caso, uma possível hipótese seria uma adaptação da levedura L9A ao novo meio, com produção de biosurfactante inicialmente, sendo este rapidamente consumido, em seguida, a fim de facilitar o crescimento da L9A no meio contendo o efluente oleoso. Enquanto isso, LD apresentou medidas de até 1,3 cm, em 96 horas de crescimento, mostrando igual propensão à síntese de biosurfactante capaz de promover emulsões do tipo água em óleo. Além disto, as linhagens se mostraram aptas a reduzir a Demanda Química de Oxigênio em até 60%, em cerca de 240 horas de tratamento, indicando grande potencial biodegradador.

Sob diferentes ensaios de tratamento do efluente, as atividades de emulsificação das linhagens se mostraram ligeiramente diferentes. Tal fato poderia ser explicado pela diferença de condições de cultivo, pois a complexa mistura de hidrocarbonetos que compõe o efluente da oficina poderia garantir uma degradação incompleta e seletiva, iniciada pelo consumo dos hidrocarbonetos mais facilmente degradáveis, restando hidrocarbonetos de maior dificuldade de degradação ao fim do período de cultivo. Ao serem cultivadas em menor tempo, por outro lado, as linhagens não dispunham de tempo suficiente para a obtenção de maiores quantidades de biosurfactantes dispersos no meio de cultura, inibindo um melhor processo de degradação e, por conseqüência, melhores resultados nos testes de emulsificação. Já, em relação à atividade emulsificante, as leveduras LD e L7A se sobressairam por produzirem biosurfactantes capazes de emulsificar tolueno em uma fase aquosa derivada do cultivo das linhagens em concentrações menores da fonte de carbono. Os resultados indicam uma resposta mais rápida, em 72 horas, e melhor da linhagem L7A com o cultivo em meio contendo o efluente a 25%, quando comparados os halos formados em emulsões água em óleo com o cultivo em 50%, para a mesma linhagem, enquanto que bons valores de absorbância foram conseguidos com 120 horas de cultivo nas duas

concentrações da fonte de carbono. Por outro lado, a linhagem LD apresentou melhores resultados em emulsões do tipo óleo em água, com absorvância chegando a 1,6 no cultivo em 25% do efluente, em 96 horas e 120 horas, em 50%. A absorvância para esta linhagem alcançou níveis máximos em 120 horas de crescimento sob as duas concentrações. Mais ainda, a LD apresentou valores de tensão superficial iguais a 38,0 mN/m em 72 horas e 36,5 mN/m num período de 48 horas, para biosurfactantes produzidos pela cepa sob concentrações do efluente a 25% e 50%, respectivamente. Para a linhagem L7A os valores mínimos de tensão superficial foram alcançados em 144 horas de cultivo, para ambas as concentrações de 25 e 50% da fonte de carbono. Para a concentração de 25%, 31,2 mN/m foram conseguidos enquanto que para a concentração de 50%, 31,02 mN/m foram alcançados, mostrando valores bastante significativos em matéria de redução da tensão superficial.

Ao se tentar extrair os biosurfactantes por acidificação com HCl 37%, uma quantidade muito pequena de precipitado foi formada, resultando em baixo rendimento. Com isto, evidenciou-se que tal extração foi ineficiente em relação a ambas as linhagens (além de rendimento muito baixo, os extratos liofilizados não produziram resultados significativos em testes de emulsificação) ou este resultado poderia indicar um caráter não iônico dos biosurfactantes. Já a extração com clorofórmio e metanol se destacou como a melhor metodologia para as duas linhagens de leveduras, pois foram obtidos rendimentos de 2,09 g/L e 1,8g/L para o biosurfactante produzido pela linhagem LD, em presença da fonte de carbono a 25% e 50%, respectivamente. Para L7A foram conseguidos rendimentos de 3,31g/L e 2,58g/L para as duas diferentes concentrações do efluente, 25% e 50%.

Durante a análise por Cromatografia em Camada Delgada, pôde-se perceber que os biosurfactantes de ambas as linhagens poderiam ser compostos por frações lipídicas e possuir grupamento amino livre, graças às reações observadas com o borrifamento de rodamina 6G e ninidrina, respectivamente. Mais ainda, o biosurfactante da LD poderia possuir algum tipo de éster de fosfato em sua composição, pelo resultado obtido com o reagente azul de molibdênio.

As linhagens, identificadas ao final como *Geotrichum terrestre* e *Cryptococcus laurentii*, mostraram comportamento bastante satisfatório em relação à produção de biosurfactantes, solubilização e utilização do efluente oleoso da oficina, bem como a redução da DQO desta fonte de carbono, evidenciando seu alto potencial em biorremediação e incentivando a continuação de estudos nesta mesma linha de pesquisa.

7. BIBLIOGRAFIA

ABD-ALLAH, A. I.; SRORR, T.. Biodegradation of anionic surfactants in the presence of organic contaminants. Water Research, 32(3): 944-947. 1998.

ABU – RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; KHAMIS, A.. Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant – producing *Rhodococcus bacterium*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 7: 53 – 61. 1991.

BANAT, I. M., SAMARAH, N., MURAD, M., HORNE, R. e BANERJEE, S.. "Biosurfactant production and use in oil tank clean-up". World Journal of Microbiology and Biotechnology, 7, 53-61. 1991.

BANAT, I. M.. " Characterization of biosurfactants and their use in pollution-removal-state of the art (Review)". Acta Biotechnologica, 15 (3): 251-267. 1995.

BARRIGA, J. A. T.; COOPER, D. G.; IDZIAK, E. S.; CAMERON, D. R.. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 96 – 102. 1999.

BICCA, F. C., FLECK, L. C. e AYUB, M. A. Z.. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. Revista de Microbiologia, 30: 231 – 236. 1999.

BOGNOLO, G.. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces 152: 41-52. 1999.

CARVALHO, D.; MARCHI, D.D.; DURRANT, L.R.. Biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2, p. 686 – 691. São Carlos, 1996.

CARVALHO, D.; MARCHI, D.D.; DURRANT, L.R.. Production of extracellular surface – active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. In: INTERNATIONAL IN SITU AND ON - SITE BIOREMEDIATION – microbial considerations, 4, p. 91 – 96. New Orleans, 1997a.

CARVALHO, D.; MARCHI, D.D.; DURRANT, L.R.. Surface active emulsifying agents produced by microorganisms isolated from oil-contaminated soil. In: CONFERENCE PROCEEDINGS – ENVIRONMENTAL STRATEGIES FOR THE 21STCENTURY.1998, Singapore. Proceedings. Singapore: National University, 1998. p. 564 – 569.

CASAS, J. A., LARA, S. G.; GARCIA-OCHOA, F.. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. Enzyme and Microbial Technology, 21: 221-229. 1997.

CIRIGLIANO, M. C. e CARMAN, G. M.. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Applied Environmental Microbiology, 50 (4): 846 – 850. 1985.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G.. Surface-active from two *Bacillus* species. Applied Environmental Microbiology, 53(2): 224-229. 1987.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.. Surface-active compounds from microorganisms. Advances in Applied Microbiology, 26, 229-251. 1980.

CORTI, A.; FRASSINETTI, S.; VALLINI, G.; D'ANTONE, S.; FICHI, C.; SOLARO, R.. Biodegradation of nonionic surfactants. I. Biotransformation of a 4-(1-nonyl)phenol by a *Candida maltosa* isolate. Environmental Pollution, 90(1): 83 – 87. 1995.

DANIEL, H.J., REUSS, M.; SYLDATK, C.. Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapessed oil in a two-stage fed batch process using with *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Criptococcus curvatus* ATCC 20509. Biotechnology Letters, 20 (12) :1153-1156. 1998.

DANIEL, H.J., OTTO, R.T., BINDER, M. et al. Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Criptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. Applied Microbiology and Biotechnology, 51 (1) :40-45. 1999.

DITTMER, J. C.; LESTER, R. L.. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on TLC. Journal of Lipid Research, 5(1): 126 – 127. 1964

FALATKO, D. M.; NOVAK, J. T.. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. Water Environment Research, 64 (2): 163-169. 1992.

FERRAREZO, E. M.. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão. Campinas:1998. p. 117. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA - UNICAMP, Campinas.

GARCIA-OCHOA, F.; CASAS, J. A.. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicula*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 613 – 621. 1999.

GEORGIU, G., LIN, S. C.; SHARMA, M. M.. Surface-active compounds from microorganisms. Bio/Technology, 10: 60-65. 1992.

GREENBERG, A.E., CLESCERI, L.S.; EATON, A.D.. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18 ed., Washington: American Public Health Association, 1992.

HOROWITZ, S., GILBERT, J.N.; GRIFFIN, W.M.. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. Journal of Industrial Microbiology, 6:243-248 1990.

HU, Y.; JU, L. K.. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. Journal of Biotechnology, 87: 263-272. 2001

JACOB, Z.. Yeast lipids: extraction, quality analysis, and acceptability. Critical Reviews in Biotechnology, 12(5/6): 463-491. 1992.

JACOB, Z.. Yeast lipid biotechnology. Advances in Applied Microbiology, 39: 185-212. 1993.

JACOBUCCI, D.F.C.. Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos. Campinas:2000. p. 117. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA - UNICAMP, Campinas.

JOHNSON, V., SINGH, M., SAINI, V. S., SISTA, V. R.; YADAV, N. K.. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. Biotechnology Letters, 14(6): 487-490. 1992.

KIM, H. S., YOON, B. D., LEE, C. H., SUH, H. H., OH, H. M., KATSURAGI, T.; TANI, Y.. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. Journal of Fermentation and Bioengineering, 84 (1): 41-46. 1997.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y.. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp SY16. Applied Microbiology and Biotechnology, 52 (5): 713-721. 1999.

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

KOSARIC, N., CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (edited by). Biosurfactants and Biotechnology. Surfactant science series, Marcel Dekker, New York , vol 25, 1987.

KUMARAN, P.; SHIVARAMAN, N.. Biological treatment of toxic industrial wastes. In: Biotreatment Systems, DL Wise Ed., CRC Press, Boca Raton, Fl. vol. 1, 1988.

KUSHIDA, M.M.. Caracterização parcial e propriedades de biosurfactantes bacterianos. Campinas:2000. p. 78. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA - UNICAMP, Campinas.

MAKKAR, R.; CAMETROA, S.. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 58 (4): 428-434. 2002.

MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R. N.; GIBBS, B. F.. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineering Geology, 60: 371-380. 2001.

OKPOKWASILI, G. C.; MOLOKWU, C. N.. Yeast and mould contaminants of vegetable oils. BioresourceTechnology, 57: 245 – 249. 1996.

PALITTAPONGARNPIM, M; POKETHITIYOOK, P.; UPATHAM, E. S.; TANGBANLUEKAL, L.. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. Biodegradation 9: 83 – 90. 1998.

PITTER, P.; CHUDOBA, J.. Biodegradation of organic substances in the aquatic environment. CRC Press (1990).

RADWAN, S. S.; SORKHOH, N. A.. Lipids of n-alkane-utilizing microorganisms and their application potencial. Advances in Applied Microbiology, 39: 29-90. 1993.

REDDY, P. G., SINGH, H. D., PATHAK, M. G., BHAGAT, S. D.; BARUAH, J. N.. Isolation and funcional characterization of hydrocarbon emulsifying and solubilizing factors produced by a *Pseudomonas* species. Biotechnology and Bioengeneering, 15: 387-401. 1983.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E.. Biosurfactants and oil bioremediation. Current Opinion in Biotechnology, 13: 249-252. 2002.

RUDD, L. E., PERRY, J. J., HOUK, V. S., WILLIAMS, R. W.; CLAXTON, L. D.. Changes in mutagenicity during crude oill degradation by fungi. Biodegradation, 7 (4): 335-343. 1996.

SAMPAIO, R. M.. Estudo da produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lypolitica* por fermentação de óleo-diesel comercial. Campinas:1995. p. 80. Dissertação de mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA - UNICAMP, Campinas.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S.. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. Journal of Biotechnology. 40: 207-217. 1995.

SUNDARAM, N. S., SARWAR, M., BANG, S. S.; ISLAM, M. R.. Biodegradation of anionic surfactants in the presence of petroleum contaminants. Chemosphere, 29(6): 1253-1261. 1994.

VON SPERLINGS, M.. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. UFMG, 2^o ed., Belo Horizonte, 1996.

VELRAEDS, M.M.C.; MEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J.. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactantes released by *Lactobacillus* strains. Colloids and Surfaces B; Biointerfaces 8: 51-61. 1996.

WALKER, J. D.; COLWELL, R. R.. Biodegradation rates of components of petroleum. Canadian Journal of Microbiology, 22 (8):1209-1213. 1976.

WU, J.; JU; L. K.. Extracellular particles of polymeric material formed in n – hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biotechnology, 59: 193 – 202. 1998.

ZHOU, Q. H., KLEKNER, V.; KOSARIC, N.. Production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose. Journal of American Oil Chemists' Society, 69(1): 91. 1992.

ZHOU, Q. H.; KOSARIC, N.. Utilization of canola oil and lactose to produce biosurfactant with *Candida bombicola*. Journal of American Oil Chemists' Society, 72(1): 67-71. 1995.

ZINJARDE, S. S., PANT, A.; DESHPANDE, M. V.. Dimorphic transition in *Yarrowia lipolytica* from oil-polluted sea water". Mycological Research, 102(5): 553-558. 1998.

ZOUARI, N.; ELLOUZ, R.. Microbial consortia for the aerobic degradation of aromatic compounds in olive oil mill effluent. Journal of Industrial Microbiology, 16 (3): 155-162. 1996)

8. APÊNDICES

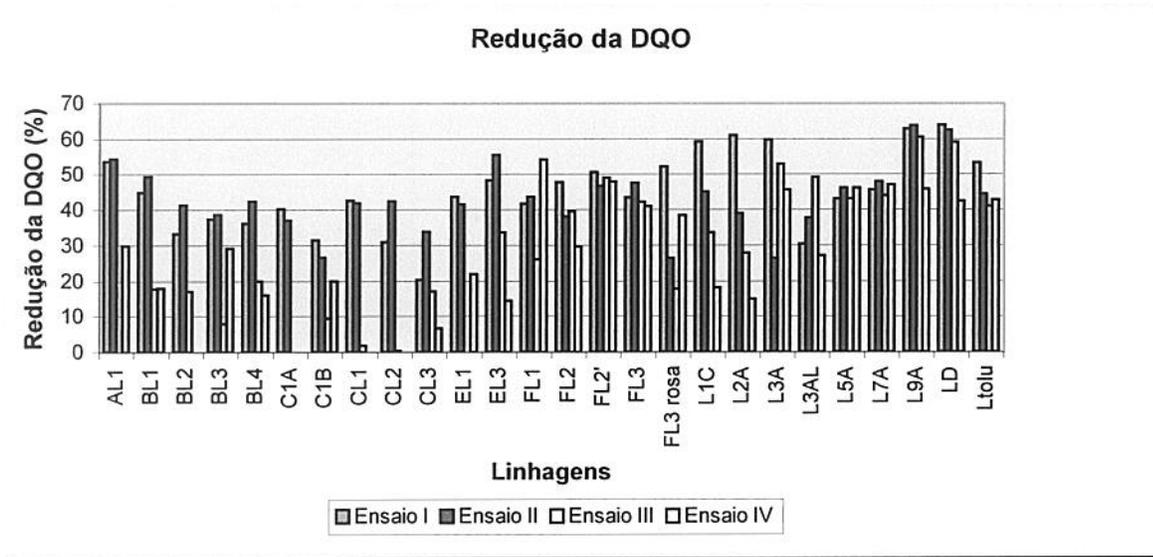
APÊNDICE 1: Médias das duplicatas das alturas de halos alcançados, de cada amostra

Altura das colunas de emulsificação (cm)				
linhagens	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio III	Ensaio IV
AL1	0,5	0,7	0,5	0,5
BL1	0,5	0,3	0,5	0,6
BL2	0,1	0,2	0,1	0,2
BL3	0,1	0,3	0,1	0,1
BL4	0,4	0,5	0,4	0,4
C1A	0,3	0,5	0,3	0,2
C1B	0,8	0,5	0,4	0,5
CL1	1,6	0,1	0,7	0,6
CL2	1,4	0,4	1,4	1,2
CL3	1,4	1,2	0,8	1,1
EL1	1,2	0,7	0,6	0,3
EL3	1,4	0,8	1,2	0,8
FL1	1,3	1,2	0,7	0,5
FL2	1,3	0,8	1,1	0,6
FL2'	1,1	0,6	0,4	1,3
FL3	1,2	0,5	0,8	0,3
FL3 rosa	1,6	0,9	0,4	0,7
L1C	1,5	1,1	1,3	0,5
L2A	1,3	1,2	0,9	0,6
L3A	1,1	1,1	0,4	0,5
L3AL	0,6	0,9	1,3	1,2
L5A	0,8	0,6	0,2	0,3
L7A	0,6	0,5	0,7	0,3
L9A	0,9	0,3	0,4	1,6
LD	0,2	0,2	0,3	0,4
Ltolu	1,3	1,1	0,7	0,4
controle	0,1	0,1	0,1	0,1

APÊNDICE 2: Médias das duplicatas de DQO encontrados para cada amostra

linhagens	Valores de DQO (mg/L)			
	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio III	Ensaio IV
AL1	2476,744	2930,256	6617,7	4720,626
BL1	3279,07	3244,212	5205,924	5514,75
BL2	3976,744	3767,472	5250,042	7764,768
BL3	3732,558	3941,892	5823,576	4764,744
BL4	3802,326	3697,704	5073,57	5647,104
C1A	3558,14	4046,544	6750,054	6970,644
C1B	4081,395	4709,34	5735,34	5382,396
CL1	3418,605	3732,588	6220,638	7191,234
CL2	4116,279	3697,704	6308,874	6970,644
CL3	4744,186	4250,034	5250,042	6264,756
EL1	3361,138	3750,03	6970,644	5250,042
EL3	3083,358	2861,134	4200,035	5748,435
FL1	3472,25	3611,14	4683,91	3077,445
FL2	3110,24	3972,254	3832,29	4722,62
FL2'	2944,468	3416,694	3232,285	3503,255
FL3	3365,223	3365,223	2303,245	3967,775
FL3 rosa	2843,483	2113,047	4219,39	4141,97
L1C	2426,091	3521,745	4200,035	5496,82
L2A	2321,743	3913,05	4567,78	5709,725
L3A	2400,004	2113,047	2980,67	3658,095
L3AL	4152,149	3999,976	3212,93	4896,815
L5A	1869,554	1934,771	3600,03	2651,635
L7A	1739,12	2556,526	2574,215	2012,92
L9A	1782,598	1891,293	2496,795	2670,99
LD	2152,161	2413,029	2593,57	2935,5
Ltolu	2782,592	3565,196	3735,515	3851,645
controle	5956,486	6413,005	6329,085	6716,185

APÊNDICE 3: Valores em porcentagem das variações de DQO durante os 4 ensaios diferentes.



APÊNDICE 4: Resultados do crescimento de L7A, L9A e LD em experimentos de até cinco dias de cultivo.

AMOSTRAS	MASSA SECA (g/L)	pH	halos (cm)	Absorbância (A_{610})
Controle (24h)	4,29	6,51	0,2	0
Controle (48h)	2,14	6,74	0,1	0,201
Controle (72h)	5	5,56	0	0,29
Controle (96h)	5,71	6,38	0,20	0,265
Controle (120h)	8,57	6,83	0,1	0,196
Controle (144h)	7,86	6,35	0	0,21
L7A (24h)	9,28	6,335	0,0667	0,45
L7A (48h)	6,43	6,915	0,0667	0,72
L7A (72h)	14,28	6,57	0,41	0,822557
L7A (96h)	19,28	6,975	0,31	1,150333
L7A (120h)	18,57	6,82	0,094333	1,295967
L7A (144h)	18,57	6,72	0,12	1,2513
L9A (24h)	9,28	7,045	0,65	0,388
L9A (48h)	5	6,51	0,2	0,695
L9A (72h)	13,57	6,355	0,15	0,589
L9A (96h)	7,14	7,12	0,25	0,636
L9A (120h)	13,57	6,675	0,35	0,952
L9A (144h)	20,71	6,56	0,4	0,801
LD (24h)	19,28	6,125	0,2	0,25
LD (48h)	12,86	6,18	0,15	0,372
LD (72h)	8,57	6,945	0,35	1,131833
LD (96h)	13,57	6,62	0,53	1,6011
LD (120h)	15,71	7,44	0,5	1,3233
LD (144h)	14,28	6,87	0,35	1,3267

APÊNDICE 5: Resultados do tratamento de L7A e LD em experimentos com cinco dias de cultivo, sob 2 concentrações de efluente.

Tabela 5.2: redução da Demanda Química de Oxigênio em diferentes concentrações.

Tratamento	Tempo (dias)	DQO (mg/L)	Redução da DQO (%)
LD-Controle	5	6740	-
25%	10	ND	-
LD-Controle	5	6620	-
50%	10	6716	-
L7A-Controle	5	6740	-
25%	10	ND	-
L7A-Controle	5	5620	-
50%	10	6716	-
LD-25%	5	6876	0
	10	ND	-
LD-50%	5	7650	0
	10	3871	42,3
L7A-25%	5	6170	8
	10	ND	-
L7A-50%	5	5846	13,3
	10	3561	47

