

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

## VERTICALIZAÇÃO DA CBPC MEDIANTE A PRODUÇÃO DE EMULSIFICANTES A PARTIR DO CO-PRODUTO GLICERINA

**Ayane de Queiroz Cordeiro<sup>1</sup>; Pablo Rodrigo Fica Piras<sup>2</sup>; Juliana Thais dos Santos Silva<sup>3</sup>**

1. Bolsista PIBIC/UEFS, Concluinte do curso de bacharelado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ayanequeiroz@yahoo.com.br

2. Orientador, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: pafipi@uefs.br

3. Pesquisadora, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: julianathais@gmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodiesel, glicerina, bioprospecção, biotensoativos.

### INTRODUÇÃO

A utilização de fontes complementares e alternativas de energia é uma das grandes prioridades atuais, visando contornar alguns graves problemas ocasionados pelo desenvolvimento tecnológico. A crescente preocupação com a poluição e a crise energética tem estimulado o mercado mundial de biocombustíveis (BILGEN *et alii*, *apud* RIVALDI, 2007).

A produção de biodiesel no Brasil apresenta vantagens, devido à potencial disponibilidade farta de matéria-prima. Esta produção encontra-se significativamente acelerada, desde que o governo estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao combustível de petróleo, com a Lei 11.097/2005 (BRASIL, 2005).

A produção do biodiesel, mediante a alcoólise (etapa também chamada de transesterificação) de óleos vegetais e animais, gera uma grande quantidade de glicerol (também chamada de glicerina) como subproduto. Visando evitar problemas com o acúmulo deste co-produto, é pertinente encontrar novas opções para a sua utilização direta, ou dos seus derivados. Entre estes derivados encontram-se os mono- e di-ésteres graxos de glicerol, que, entre outras possíveis aplicações, são utilizados como emulsificantes na indústria de alimentos: visto que atualmente esses materiais são importados, é apropriado desenvolver conhecimento nacional a respeito da produção deles (PEREIRA-SOARES e SILVA, 2007).

Tensoativos (também nominados com o anglicismo *surfactantes*) são compostos capazes de reduzir a tensão interfacial nas interfaces entre líquidos, sólidos e gases, permitindo-lhes reduzir a superfície de contato e, decorrentemente, se misturar e dispersar facilmente como emulsões, um(ns) em outro(s) (BANAT *et alii*, 2000). São moléculas anfífilas, que consistem de um domínio hidrofílico e outro hidrofóbico: enquanto que no segundo caso frequentemente se trata de uma cadeia hidrocarbonácea, para o componente polar ocorrem muitas variações (GEORGIU *et al*, 1992).

Quando originados do metabolismo microbiano são denominados biotensoativos, e incluem uma vasta gama de estruturas químicas, tais como glicolípídeos, lipopeptídeos, proteínas polissacarídeos complexos, fosfolípídios, ácidos graxos e lipídios neutros (RODRIGUES *et alii*, 2006).

São várias as vantagens dos biotensoativos sobre os tensoativos químicos. Estes apresentam menor toxicidade, maior biodegradabilidade e eficácia em condições extremas de temperatura e pH (RODRIGUES *et alii*, 2006).

O maior mercado para os biotensoativos é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo, incorporados a formulações de óleos lubrificantes, na biorremediação e dispersão de óleo derramado, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e a recuperação terciária de petróleo. Outras aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais: alimentícias e cosméticas, de produtos de limpeza industrial e de produtos agrícolas também fazem uso dos tensoativos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

## METODOLOGIA

Foram coletadas 5 amostras de solo no campo de produção de Buracica, distrito de Alagoinhas, estado da Bahia. Uma das amostras foi recolhida dos arredores de um poço de produção de petróleo e as outras quatro de uma região chamada Fazenda Panelas, por onde passam tubulações que escoam petróleo, em um local onde já tinha tido um derramamento acidental, seis meses antes da época da coleta. Destas amostras foram preparados isolados de microrganismos, utilizados nas etapas subseqüentes.

Para propagação das amostras, foram utilizadas alíquotas de 100g de amostra homogeneizadas durante 5 minutos em 500 mL de solução salina a 5%, contendo óleo diesel em proporção de 5% v/v e deixadas em repouso durante 5 minutos. Posteriormente, foi retirado 1mL da mistura e inoculado em placas de Petri contendo meio sólido com a seguinte composição, por litro: 125g NaCl, 160g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1g extrato levedura, 1g extrato de carne, 15g Agar. Os inóculos foram incubados a 37°C por 15 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

Para a determinação da morfologia, foi feita a coloração de Gram das diferentes colônias encontradas nas culturas em placa.

Para a verificação da produção de tensoativos, inocularam-se os isolados B1, B2, B3, B5, B10 e B11, primeiramente em meio KAY (5 mL glicerol, 2g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5g NH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.) a 30°C, 200 rpm, por 24, em seguida estes isolados foram inoculados em meio STB (10mL glicerol, 0,4g ácido cítrico, 1g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,53g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,4g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2mL de solução de oligoelementos (MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1mg), CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (250mg), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (250mg), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (25mg), NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (10mg), CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (10mg), Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (5mg)) também a 30°C, 200 rpm, por 6 dias (144 horas). Em seguida foram reinoculados em um novo meio STB, por mais 6 dias, totalizando 12 dias (288 horas). Os isolados restantes continuaram em incubação no mesmo inóculo por mais 6 dias, totalizando os mesmos 12 dias de incubação.

Para medir a tensão superficial utilizou-se o princípio do estalagmômetro, em instalação com bureta e erlenmeyer, medindo densidade do líquido, volume e raio das gotas dele em gotejamento (BEHRING *et alii*, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das alternativas para obter boa eficiência na produção de tensoativos é isolar linhagens de microrganismos da natureza e cultivar essas cepas para determinar se elas possuem capacidade de produção aumentada ou superior (ROONEY, 2009). Degradação de hidrocarbonetos por microrganismos presentes no solo contaminado é o principal método para remover os poluentes hidrocarbonetos do solo (BANAT, 2000). Segundo Barathi e Vasudevan (2001), microrganismos que assimilam petróleo ou derivados são encontrados em locais em que ocorre contaminação ou em áreas que, historicamente, tenham sido expostas a algum tipo de contaminação por hidrocarboneto.

Na tentativa de isolar linhagens bacterianas que produzem tensoativos, a estratégia foi isolar cepas do solo sobre o qual houve vazamento de petróleo, usando óleo diesel como fonte placas semeadas para as 4 amostras de solo coletadas no local onde houve vazamento de petróleo, 7 placas apresentaram crescimento de colônias, sendo que em 4 delas, percebeu-se o crescimento de dois tipos de colônias distintos.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Esses dados demonstram a capacidade desses microrganismos de emulsificar esses hidrocarbonetos do petróleo, durante o processo da degradação desses substratos, e provavelmente produzir de carbono. Como resultado, das 5 amostras analisadas, somente a amostra retirada do poço de captação de petróleo não apresentou crescimento celular no tempo de incubação proposto. E das 12 biotensoativos nestas condições.

Segundo Wetler (2006), as espécies observadas após a incubação do sedimento com o petróleo, provavelmente representam a comunidade de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, que aumentou em número para ocupar os nichos disponíveis após a morte dos microrganismos que não foram capazes de utilizar o petróleo.

A partir do crescimento das culturas em placas foram feitos um total de 11 esfregaços para determinação da morfologia dos microrganismos.

**Tabela 1:** Gram, morfologia e tensão superficial das amostras de bactérias isoladas (controle  $\gamma = 75$  [dina/cm])

isolados	Gram	morfologia	$\gamma$ [dina/cm]
B1	-	bacilos sem arranjo característico	82
B2	+	filamentos longos	67
B3	-	bacilos longos, sem arranjo característico	79
B4	+	filamentos longos	79
B5	-	cocos sem arranjo característico	77
B6	-	bacilos sem arranjo característico	80
B7	-	bacilos pequenos, sem arranjo característico	80
B8	-	bacilos pequenos, sem arranjo característico	79
B9	-	bacilos pequenos, sem arranjo característico	76
B10	-	bacilos pequenos sem arranjo característico	77
B11	-	bacilos longos, sem arranjo característico	80

Como mostra a Tabela 1, na coloração de Gram foi encontrado em cocos Gram negativos; dois filamentos longos Gram positivos, os quais podem se tratar da mesma bactéria, pelas suas semelhanças morfológicas; e bacilos Gram negativos, sendo os isolados B7, B8, B9 e B10, bastante semelhantes, podendo se tratar também da mesma bactéria.

Todos os meios sintéticos com crescimento dos isolados bacterianos, exceto um, evidenciaram resultados de tensão superficial maiores aos do controle (o meio de cultura sem inoculação). Embora isso pareça indicar que neles não ocorreu a produção de tensoativo, nem conseqüentemente redução da tensão superficial, o aumento da concentração de microrganismos no meio modifica outras características do meio (eleva-se a viscosidade por exemplo, reduz-se o teor de açúcares, por exemplo), o que permite pensar que a medida direta da tensão superficial no meio com crescimento bacteriano insere um possível erro por superestimação, medidas com falso-negativos. Ou seja, a determinação direta não indica necessariamente que estas bactérias não produzem tensoativos, pois só o fato de crescerem com fonte de carbono oriunda da fase oleosa já comprova a existência destas moléculas anfifílicas. A confirmação da existência ou não de tensoativos, em quantidades interessantes para a produção em maior escala, irá ser possível mediante a extração e purificação dessas moléculas.

Levisauskas e colaboradores (2004) relatam que a concentração de carbono, nitrogênio e fontes de nutrientes específicos para a taxa de crescimento celular são os mais importantes fatores que influenciam a biossíntese de biotensoativo.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das amostras de solo contaminados com petróleo, coletadas em Buracica (Alagoinhas-BA, quatro apresentaram crescimento de bactérias. Onde foram isolados cocos e bacilos Gram negativos e filamentos Gram positivos.

O presente estudo possibilitou a seleção de microrganismos com potencial biotecnológico para a degradação e emulsificação de hidrocarbonetos do petróleo.

Dos isolados obtidos, apenas o isolado B2 (bacilo Gram positivo, filamento longo), apresentou produção de biotensoativo, reduzindo a tensão superficial do meio em uma taxa de 11%. Os outros isolados apresentaram aumento na tensão superficial, o que não significa que eles não produzam tensoativos.

Este trabalho representa um estudo inicial, gerando pelo menos uma cepa produtora, que permite continuidade e aprofundamento na identificação da cepa e dos produtos, e utilização dessa cepa para produção de tensoativos em maior escala.

## REFERÊNCIAS

- BANAT I M, MAKKAR R S, CAMEOTRA S S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**:495-508.
- BARATHI S, VASUDEVAN N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International* **26**:413-6.
- BEHRING J L, LUCAS M, MACHADO C, BARCELLOS I O. 2004. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. *Quím Nova* **27**(3):492-5.
- BRASIL. 2005. *LEI n° 11.097*, de 13 de janeiro de 2005, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Disponível em [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm). Acesso em 1o de setembro de 2010.
- GEORGIU G, LIN S C, SHARMA M. 1992. Surface active compounds from microorganisms. *Biotechnology* **10**: 60-5.
- LEVISAUSKAS D, GALVANAUSKAS V, ZUNDA G, GRIGISKIS S. 2004. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. *Biotechnology Letters* **26**:1141-6.
- NITSCHKE M, PASTORE G M. 2002. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova* **25**:772-6.
- PEREIRA-SOARES V L, SILVA S S. 2007. Aproveitamento de sub- produtos do biodiesel: Preparação de monoéster de glicerina e ácido dodecanóico na presença de derivados de Nióbio. Instituto de Química, UERJ.
- RIVALDI J D, SARROUB B F, FIORILO R, da SILVA S S. 2007. Glicerol de biodiesel. *Biociencia e desenvolvimento* **37**:44-37.
- RODRIGUES L, BANAT I M, TEIXEIRA J, OLIVEIRA R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**:609-18.

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

ROONEY A P, PRICE N P J, RAY K J, KUO T-M. 2009. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol Lett* **295**:82–7.

WETLER R M C. 2006. Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo no sedimento de um manguezal localizado no sul da Bahia (Brasil). *Dissertação de mestrado em Sistemas Aquáticos Tropicais*, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-Ba.